

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Effets du peroxyinitrite sur des cellules endothéliales EAhy926 en culture: activation du facteur de transcription Nrf2 et de la voie UPR

Simon, Dorothy

Award date:
2007

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**Effets du peroxynitrite sur des cellules endothéliales EAhy926 en culture – Activation
du facteur de transcription Nrf2 et de la voie UPR**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Dorothy SIMON

Juin 2007

Effets du peroxynitrite sur des cellules endothéliales EAhy926 en culture – Activation du facteur de transcription Nrf2 et de la voie UPR

SIMON Dorothy

Résumé

Le dysfonctionnement endothélial, à la base des maladies cardiovasculaires, est caractérisé par une production et une disponibilité réduite en NO, ce qui favorise la vasoconstriction. Le peroxynitrite semble jouer un rôle clé dans ce dysfonctionnement.

L'objectif de ce mémoire est de mieux comprendre dans le modèle des cellules endothéliales EAhy926, les effets du peroxynitrite, en discriminant d'une part sa fonction de messenger secondaire déclenchant des réponses de défense au stress, et d'autre part sa toxicité pouvant mener la cellule jusqu'à l'apoptose. Pour ce faire, nous avons choisi un système expérimental de production du peroxynitrite, le SIN-1.

Dans un premier temps, nous avons testé la cytotoxicité du SIN-1 et nous avons caractérisé la production du peroxynitrite, via la sonde fluorescente HPF. Ensuite, nous avons voulu caractériser l'activation de la voie Nrf2 dans le modèle de cellules EAhy926, en suivant l'activité de liaison de ce facteur de transcription à l'ADN, son activité transactivatrice, ainsi que sa translocation dans le noyau. Nous avons également suivi l'expression de gènes cibles de Nrf2. De même, nous avons confirmé que le peroxynitrite induisait bien une réponse UPR, en suivant l'abondance de deux marqueurs de cette voie, à savoir eIF2 α phosphorylé et Grp94. Enfin, nous avons montré que le peroxynitrite induit bien des effets toxiques par nitration des protéines.

En conclusion, le peroxynitrite, à de faibles concentrations, active les voies Nrf2 et UPR qui jouent un rôle important dans l'adaptation des cellules face à un stress oxydant. A de plus fortes concentrations, le SIN-1 induit des modifications sur protéines.

Remerciements

Arrivée au terme de mon mémoire, j'ai le plaisir d'adresser mes sincères remerciements à toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont permis de réaliser ce travail de fin d'études.

Je tiens à remercier, tout particulièrement, le Professeur Martine Raes pour m'avoir permis d'intégrer l'équipe 'Athéro' afin de réaliser mon mémoire. Je vous remercie chaleureusement pour m'avoir guidée, conseillée et encouragée quand le moral était à zéro. Je vous remercie également pour votre disponibilité malgré votre emploi du temps chargé ;-), pour les nombreuses corrections apportées à ce mémoire et pour votre enthousiasme qui a toujours su me rassurer. Un grand MERCI !!!

Je tiens également à remercier Laurine qui m'a permis de prendre confiance en moi et à devenir autonome au laboratoire. Pour être toujours prête à répondre à mes questions et pour sa patience à toute épreuve dans mes grandes périodes de stress.

Je remercie également Martine VS pour son aide précieuse et ses conseils ; Cindy Gustin pour sa disponibilité malgré la situation (fin de thèse), pour ses conseils et sa BONNE HUMEUR qui met toujours un petit rayon de soleil dans le laboratoire ;-); Sofia pour son aide précieuse et mon apprentissage à la technique de RT-PCR en temps réel ; Damien qui est toujours prêt à répondre à mes questions et à m'aider ; Virginie pour son aide et son énergie communicative ;-). Je tiens aussi à remercier tous les autres doctorants qui ont pu m'aider d'une façon ou d'une autre et nos secrétaires dévouées.

Viens le tour des mémorants qui ont su mettre de l'ambiance dans notre bureau pour détendre l'atmosphère parfois lourde. Je remercie plus particulièrement Gwen pour avoir supporté la grande râleuse que je suis !!! ;-)) et pour les nombreux Bradford.

Je remercie aussi mes co-kotteurs pour leur accueil chaleureux lorsque je rentrais tard au kot et leur bonne humeur. Je remercie plus particulièrement Adrien pour sa joie de vivre et son humour qui a toujours su me donner le sourire.

Je tiens à remercier mon Gabychou, qui se soucie toujours de mon bien-être, qui me permet de relativiser les choses et qui m'a toujours soutenu et encouragé tout au long de mes études.

Je remercie également Maman pour tous les sacrifices fait pour m'avoir permis de faire des études, mes frères et ma belle-sœur Jessica pour être souvent venu me 'ravitailler', me rechercher et de s'être soucié de l'avancement du mémoire.

Merci d'avance à tous les membres du jury d'avoir accepté de porter un intérêt à ce travail.

Table des matières

I. Introduction	1
1. L'endothélium	1
1.1. Les cellules endothéliales.....	1
1.2. Dysfonctionnement endothélial	2
1.3. L'oxyde nitrique et les cellules endothéliales	3
1.4. Espèces réactives oxygénées (ROS).....	4
2. Le peroxynitrite	6
2.1. Sources de peroxynitrite.....	6
2.1.1. <i>In situ</i>	6
2.1.2. Systèmes expérimentaux	7
2.2. Les effets toxiques du peroxynitrite.....	8
2.2.1. Sur l'ADN.....	8
2.2.2. Sur les lipides.....	9
2.2.3. Sur les protéines.....	9
2.2.3.1. Réactions avec les groupements prosthétiques	9
2.2.3.2. Réactions avec les acides aminés	10
2.3. Mécanismes de détoxification du peroxynitrite	11
2.4. Le peroxynitrite en tant que messenger secondaire.....	11
2.4.1. Voie d'activation de Nrf2.....	11
2.4.1.1. La voie de Nrf2	12
2.4.1.2. Gènes cibles induits.....	13
2.4.2. Voie UPR (Unfolded Protein Response).....	14
2.4.3. Interaction entre les deux voies	17
2.5. Détection du peroxynitrite.....	17
3. Objectifs du mémoire	19
II. Matériels et méthodes	20
1. Culture des cellules endothéliales EAhy926.....	20
1.1. Repiquage des cellules EAhy926	20
1.1.1 Matériels et solutions	20
1.1.2 Méthode.....	20
1.2. Test de viabilité cellulaire : test MTT.....	20
1.2.1. Matériels et solutions	20
1.2.2. Méthode.....	21
1.3. Test de viabilité cellulaire : test à l'acridine orange/bromure d'éthidium	21
1.3.1. Matériels et solutions	21
1.3.2. Méthode.....	21
2. Dosage protéique par la méthode de Bradford.....	22
2.1. Matériels et solutions	22
2.2. Méthode.....	22
3. Dosage de l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription Nrf2: test trans-AM	22
3.1. Matériels et solutions	22
3.2. Méthodes	22
Fixation des sondes de capture double brin.....	22
Stimulation des cellules et extraction protéique	23
Méthode de Bradford	23
Fixation des extraits protéiques	23
Fixation de l'anticorps primaire	23

Table des matières

Fixation de l'anticorps secondaire et révélation	23
4. Immunofluorescence.....	24
4.1. Matériels et solutions	24
4.2. Méthode.....	24
5. Extractions protéiques.....	25
5.1. Matériels et solutions	25
5.2. Première méthode : Extraction avec le tampon de lyse « Biosource »	25
5.3. Deuxième méthode : Extraction avec le tampon de lyse proposé par la firme « Cell Signaling »	25
5.4. Troisième méthode : Extraction avec le tampon de lyse DLA.....	25
6. Western blot	25
6.1. Matériels et solutions	26
6.2. Méthodes	26
6.2.1. L'électrophorèse	26
6.2.2. Transfert des protéines sur membrane PVDF.....	26
6.2.3. Traitement de la membrane et révélation	26
7. L'extraction d'ARN.....	27
7.1. Matériels et solutions	27
7.2. Méthode.....	27
8. La transcription inverse	28
8.1. Matériels et solutions	28
8.2. Méthode.....	28
9. La PCR en temps réel	28
9.1 Matériels et solutions	28
9.2. Méthode.....	28
10. Détection du peroxynitrite grâce à la sonde HPF Fluoro Hydroxyl/ Peroxynitrite.....	29
10.1. Matériels et solutions	29
10.2. Méthode.....	29
11. Transfection.....	29
11.1. Matériels et solutions	29
11.2. Méthodes	29
11.2.1. Transfection et stimulation des cellules Eahy926.....	29
11.2.2. Evaluation de la transfection grâce au système Dual-luciférase.....	30
11.2.3. Normalisation des transfections avec le système Dual-luciférase	30
III. Résultats et discussion	31
Modèle cellulaire utilisé	31
1. Etude de la cytotoxicité : test au MTT.....	32
2. Caractérisation de la production de peroxynitrite à partir du SIN-1 avec la sonde HPF	33
3. Etude de l'effet du SIN-1 sur l'activation de la voie Nrf2	33
3.1. Activité de liaison du facteur de transcription Nrf2 à sa séquence consensus	34
3.1.1. Cinétique de temps	34
3.1.2. Effet de la concentration en SIN-1	34
3.2. Détection du facteur de transcription Nrf2 par western blot	35
3.3. Translocation nucléaire	35
3.4. Activité transactivatrice.....	36
3.5. Induction de gènes cibles du facteur de transcription Nrf2.....	37
3.6. Effets d'inhibiteurs de kinases sur l'activation de Nrf2.....	37
3.7. Discussion.....	39

Table des matières

4. Etude de l'effet du SIN-1 sur l'activation de la voie UPR.....	39
5.Effets du SIN-1 sur la nitratation des protéines	40
IV. Conclusions et perspectives.....	42
V. Bibliographie.....	47

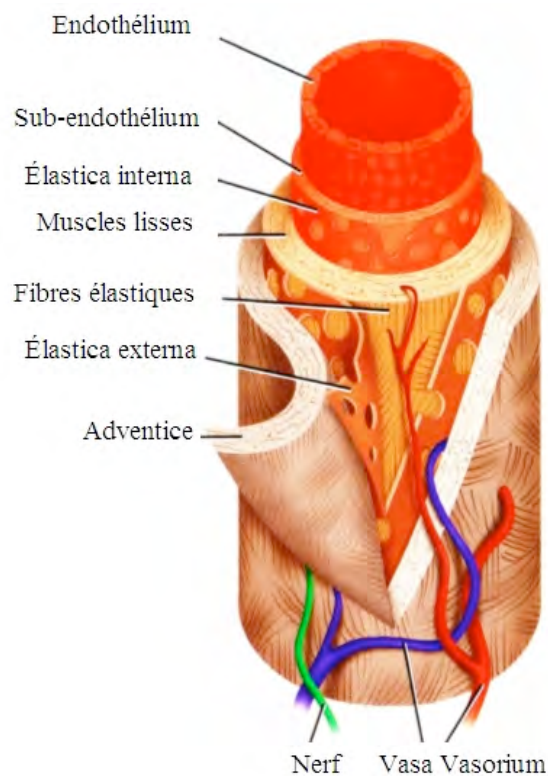


Figure I.1 : Représentation schématique de la paroi des vaisseaux sanguins illustrée ici pour une artère de gros calibre. L'endothélium, la sub-endothéliale et la limitante élastique interne constituent l'intima. La média est constituée principalement de cellules musculaires lisses et de fibres élastiques. Cette couche est délimitée par la limitante élastique interne d'une part et la limitante élastique externe d'autre part. Et enfin, l'adventice est composée de tissu conjonctif, de nerfs et de vasa vasorum (<http://www.theses.ulaval.ca/2005/22413/22413004.jpg>).

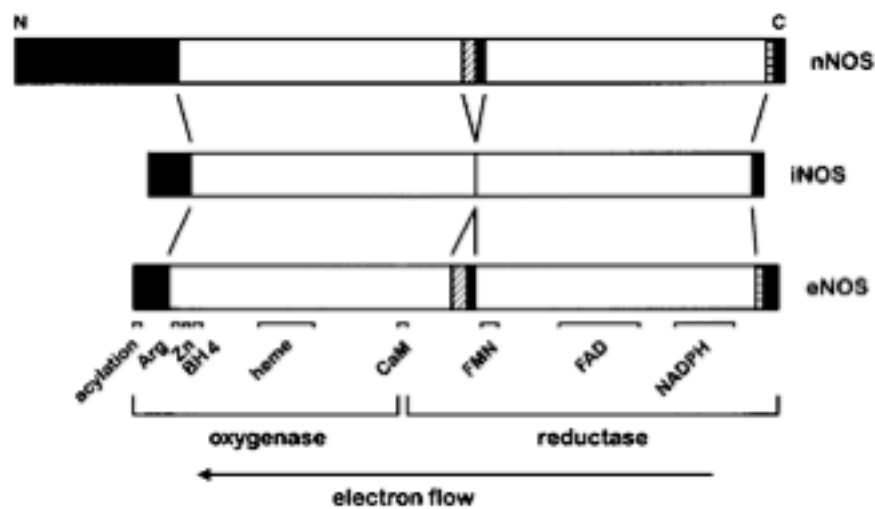


Figure I.2 : Représentation schématique des domaines caractérisant les 3 isoformes de l'oxyde nitrique synthase (NOS). La nNOS est exprimée dans les cellules nerveuses, la iNOS est la NOS inducible des cellules musculaires lisses et la eNOS est exprimée dans les cellules endothéliales. Le domaine oxygénase du côté N-terminal reprend les sous domaines Arg, Zn, BH₄, hème et CaM. Le domaine réductase du côté C-terminal reprend les sous domaines FMN, FAD et NADPH. Arg : arginine ; Zn : zinc ; BH₄ : 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine ; CaM : calmoduline ; FMN : flavine mononucléotide ; FAD : flavine adénine dinucléotide ; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (Govers and Rabelink 2001).

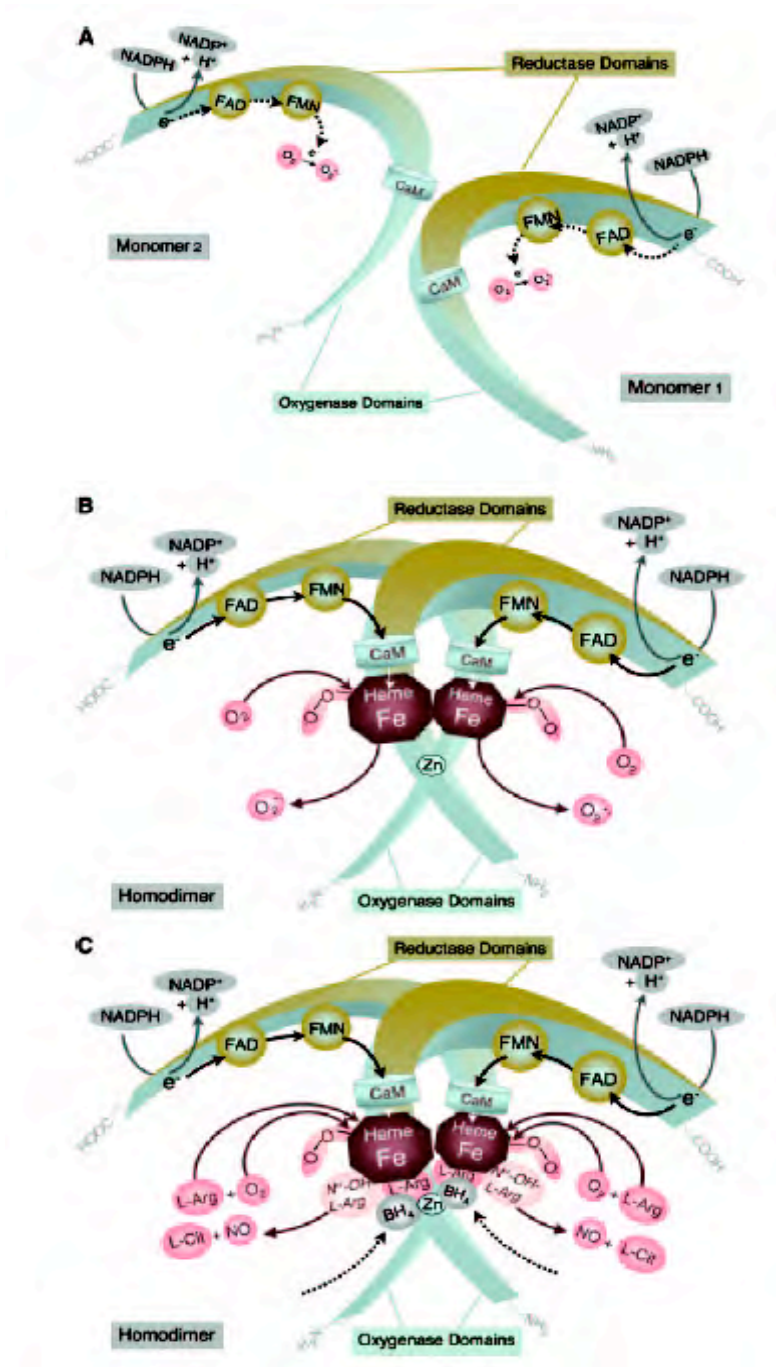


Figure I.3 : Mode de fonctionnement de la eNOS. A : Toutes les enzymes de type oxyde nitrique synthase (NOS) sont synthétisées sous forme de monomères où chaque sous-unité consiste en un domaine réductase et un domaine oxygénase. Le domaine réductase est capable de transférer les électrons du NADPH aux flavines FAD et FMN. Ce domaine peut lier la calmoduline qui a pour fonction de stimuler le transfert d'électrons du domaine réductase. B : La présence du groupement prosthétique hème permet la dimérisation de la NOS; il est le seul cofacteur requis pour la formation de NOS active. Le groupement hème est également essentiel pour l'interaction entre les domaines réductase et oxygénase ainsi que pour le transfert d'électrons entre les deux domaines. C : En présence de la L-arginine et du cofacteur BH₄, il y a réduction de l'oxygène et formation d'oxyde nitrique. La L-citrulline est un sous-produit de la réaction et la N-hydroxy-L-arginine est un intermédiaire de la réaction (Forstermann and Munzel 2006).

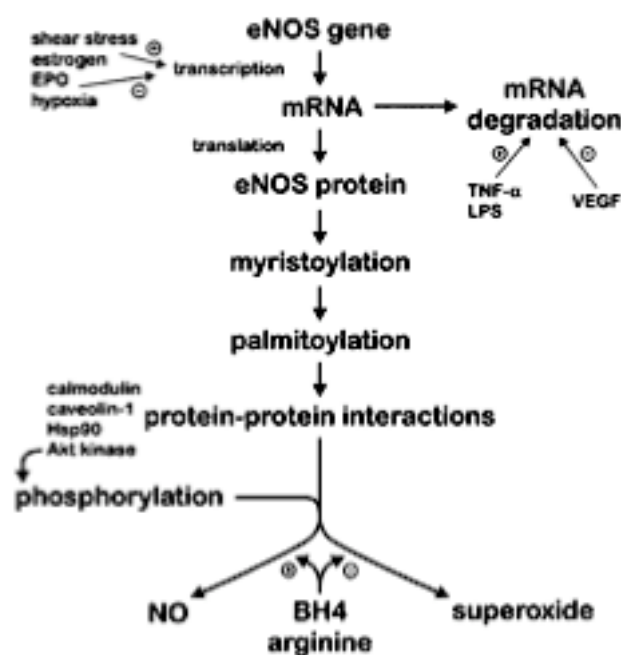


Figure I.4 : Représentation schématique des différents mécanismes moléculaires de régulation de l'expression et de l'activité de la eNOS. La transcription du gène de la eNOS est favorisée par les forces de cisaillement (shear stress) et les oestrogènes et est bloquée par l'EPO (érythropoïétine) et l'hypoxie. La dégradation de l'ARNm de la eNOS peut être médiée via le TNF α ou le LPS (lipopolysaccharide) ou empêchée via le VEGF (vascular endothelial growth factor). Si l'ARNm de la eNOS est stabilisé, il y a traduction en protéine de la eNOS. Diverses modifications post-traductionnelles sont nécessaires pour que la eNOS soit fonctionnelle. Il s'agit de modifications de types myristoylation et palmitoylation, c'est-à-dire l'acylation par l'acide myristique ou palmitique. Enfin, suite à ces modifications, il y a toute une série d'interactions protéine-protéine pour que la eNOS soit fonctionnelle. Le cofacteur BH₄ et l'arginine favorisent la formation de NO alors qu'ils entravent la formation d'anions superoxyde (Govers and Rabelink 2001).

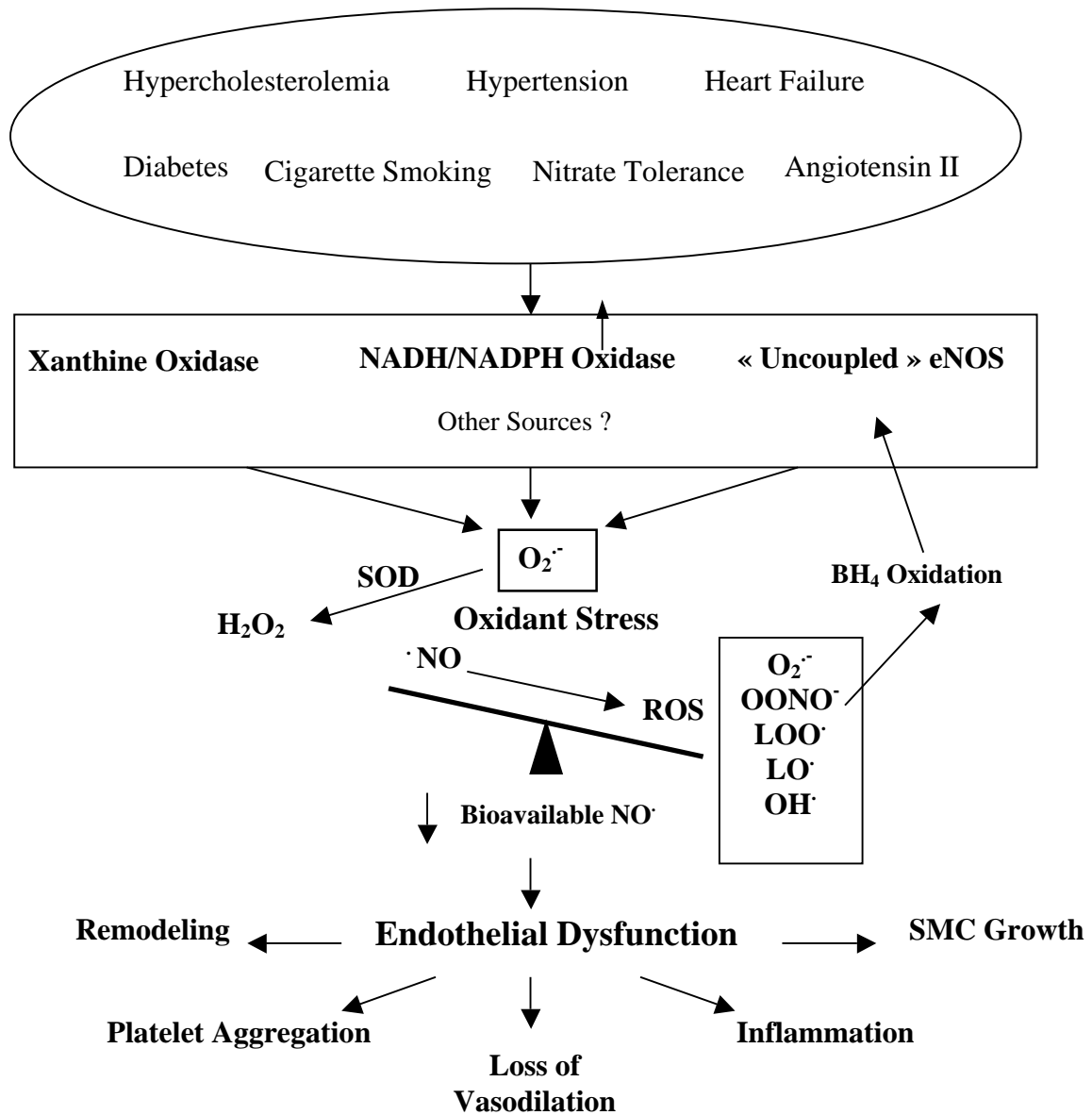


Figure I.5 : Mécanismes à la base du dysfonctionnement endothélial et rôles des stress oxydants (Cai and Harrison 2000).

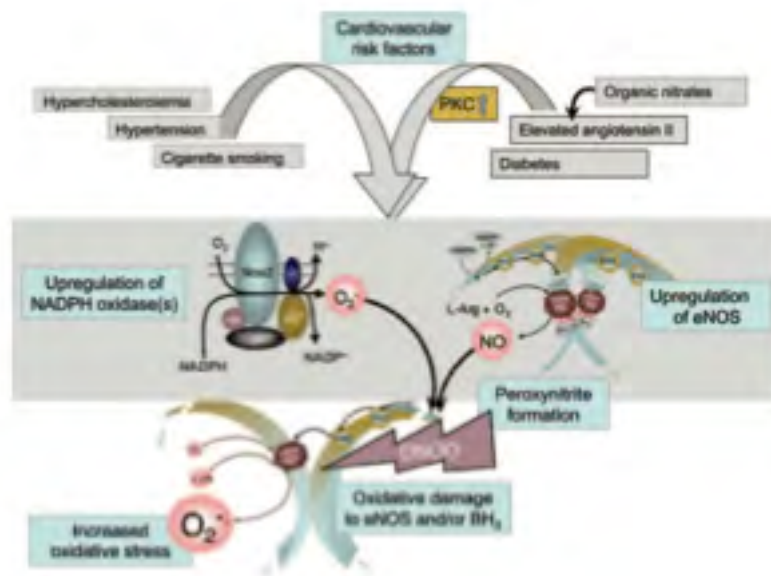


Figure I.6 : Mécanismes par lesquels les facteurs de risque cardiovasculaire conduiraient au dysfonctionnement endothélial (Forstermann and Munzel 2006)

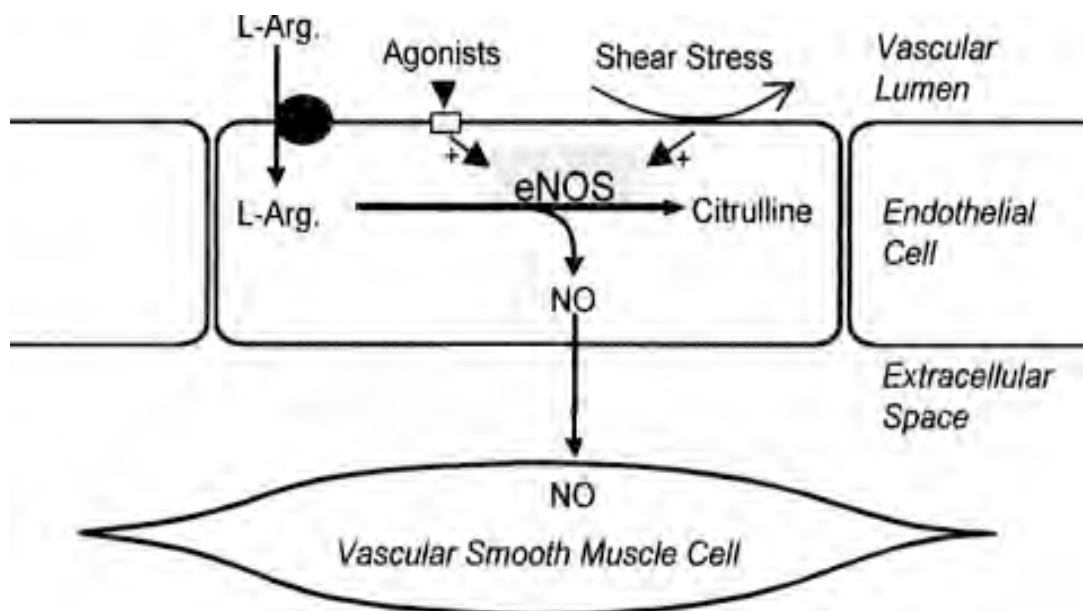


Figure I.7: Activation de la eNOS par des stimulations récepteur-dépendantes et/ou les forces de cisaillement dues au flux sanguin. Il s'ensuit la production d'oxyde nitrique qui diffuse jusque dans les cellules musculaires lisses, ce qui permet leur vasodilatation (www.Medscape.be).

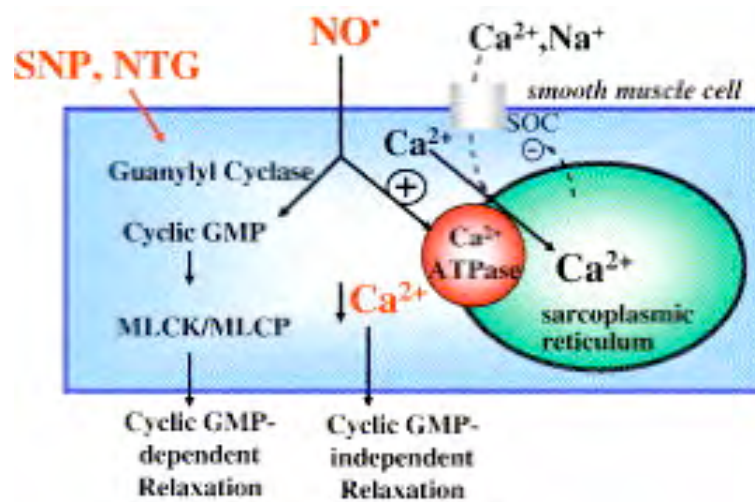


Figure I.8 : Relaxation des cellules musculaires lisses par le NO via des mécanismes GMPC dépendants et indépendants. Le NO active la guanylate cyclase, ce qui accroît la quantité de GMPC et active la protéine kinase G (PKG). Le GMPC et la PKG régulent l'activité de protéines contractiles à travers la régulation de la kinase (MLCK) et de la phosphatase (MLCP) de la chaîne légère de la myosine. Ce mécanisme est donc dépendant du GMPC. De plus, le NO active de façon prédominante les ATPases à Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique (SERCA) et permet ainsi l'entrée du Ca²⁺ dans le réticulum sarcoplasmique, ce qui fait chuter la concentration en Ca²⁺ cytosolique et permet la relaxation des cellules musculaires lisses de façon indépendante au GMPC (Cohen and Adachi 2006)

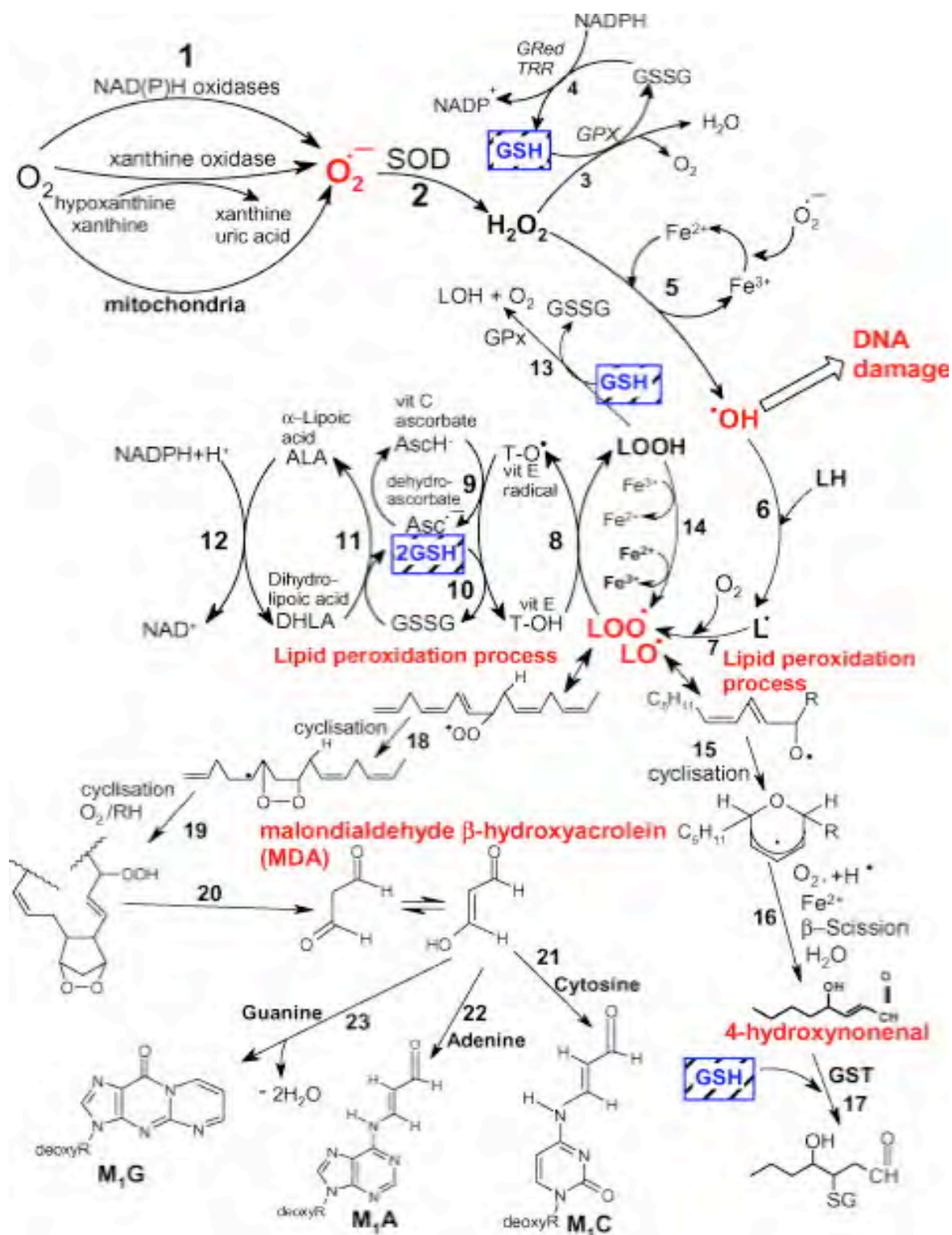


Figure I.9 : Schéma général reprenant les principales sources de ROS et les voies de détoxification. L'oxyde nitrique synthase (NOS) donne du NO à partir de la L-arginine et de l'O₂. En parallèle, il y a aussi production d'anions superoxyde par la NADPH oxydase, la xanthine oxydase et par la chaîne respiratoire mitochondriale. Le NO réagit avec les anions superoxyde pour former du peroxynitrite. Néanmoins, les anions superoxyde sont aussi détoxifiés par les Cu/Zn et Mn superoxyde dismutases en H₂O₂, le H₂O₂ est détoxifié par la catalase et la peroxydase en H₂O et O₂. H₂O₂ peut aussi se convertir par la réaction de Fenton en radical hydroxyl, extrêmement réactionnel (Valko, Leibfritz et al. 2007).

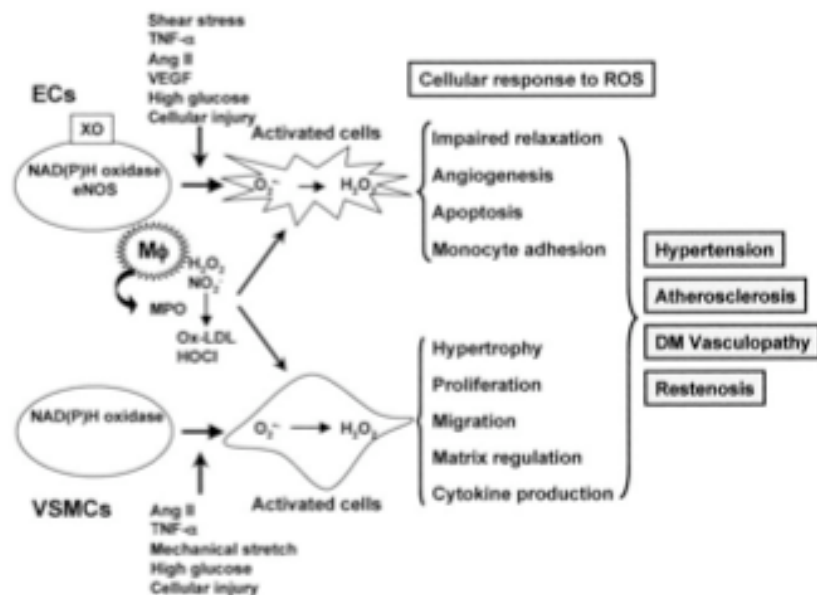


Figure I.10 : Mécanismes reprenant les différentes sources de production de ROS et leurs effets sur les différentes fonctions des cellules de la paroi vasculaire. Les facteurs pro-inflammatoires induisent des changements de phénotype qui contribuent à l'initiation de diverses réponses cellulaires qui peuvent être à l'origine de maladies cardiovasculaires (Taniyama and Griendling 2003)

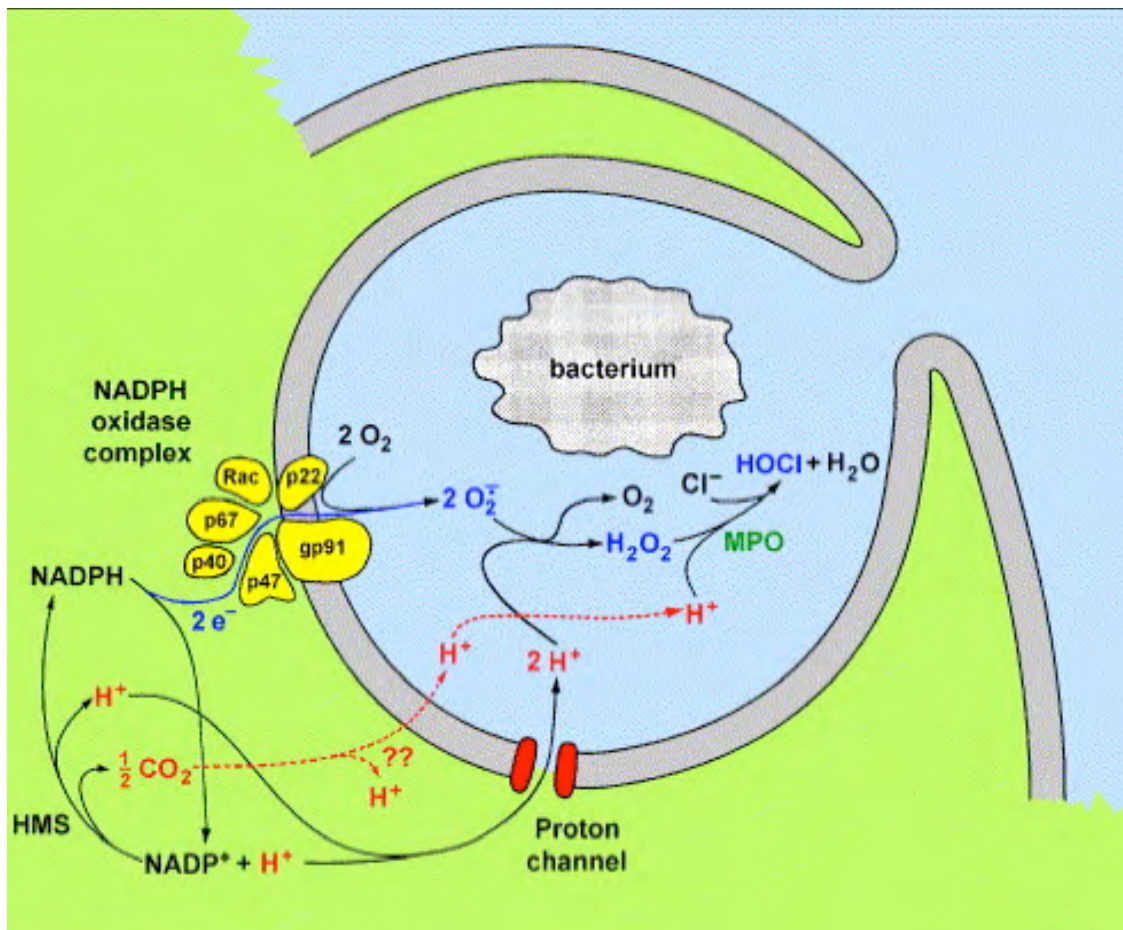
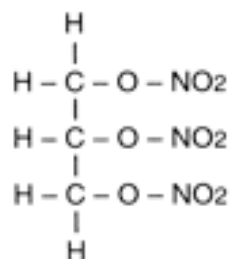


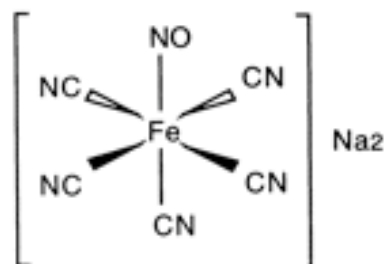
Figure I.11 : Schéma reprenant le mode de production d'HoCl par la myéloperoxydase (MPO).

Lors de la phagocytose, les électrons provenant du NAD(P)H sont transloqués à travers la membrane via le complexe de la NAD(P)H oxydase afin de réduire l'oxygène moléculaire en anions superoxyde dans le phagosome. Les anions superoxyde sont alors détectés en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire. C'est alors que la myéloperoxydase catalyse la production de HOCl et d'eau à partir du peroxyde d'hydrogène (Murphy and DeCoursey 2006)

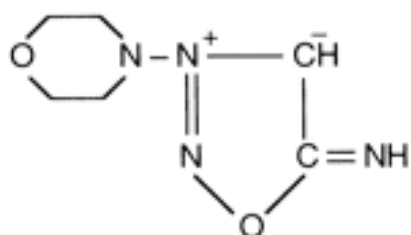
Glyceryl trinitrate (GTN)



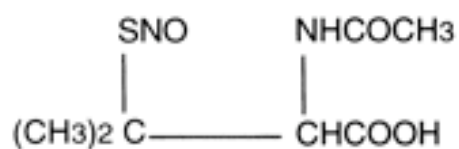
Sodium nitroprusside (SNP)



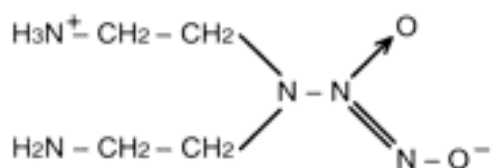
3-Morpholinosydnonimide (SIN-1)



S-Nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP)



DETA/NO



NCX 4016

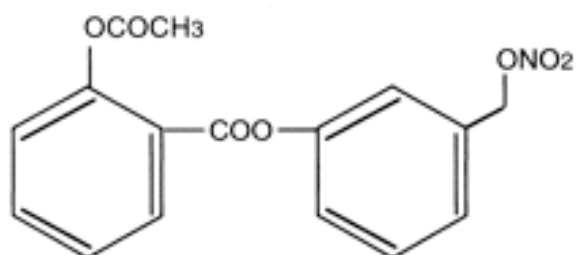


Figure I.12: Structure des différents donneurs de NO (Yamamoto and Bing 2000)

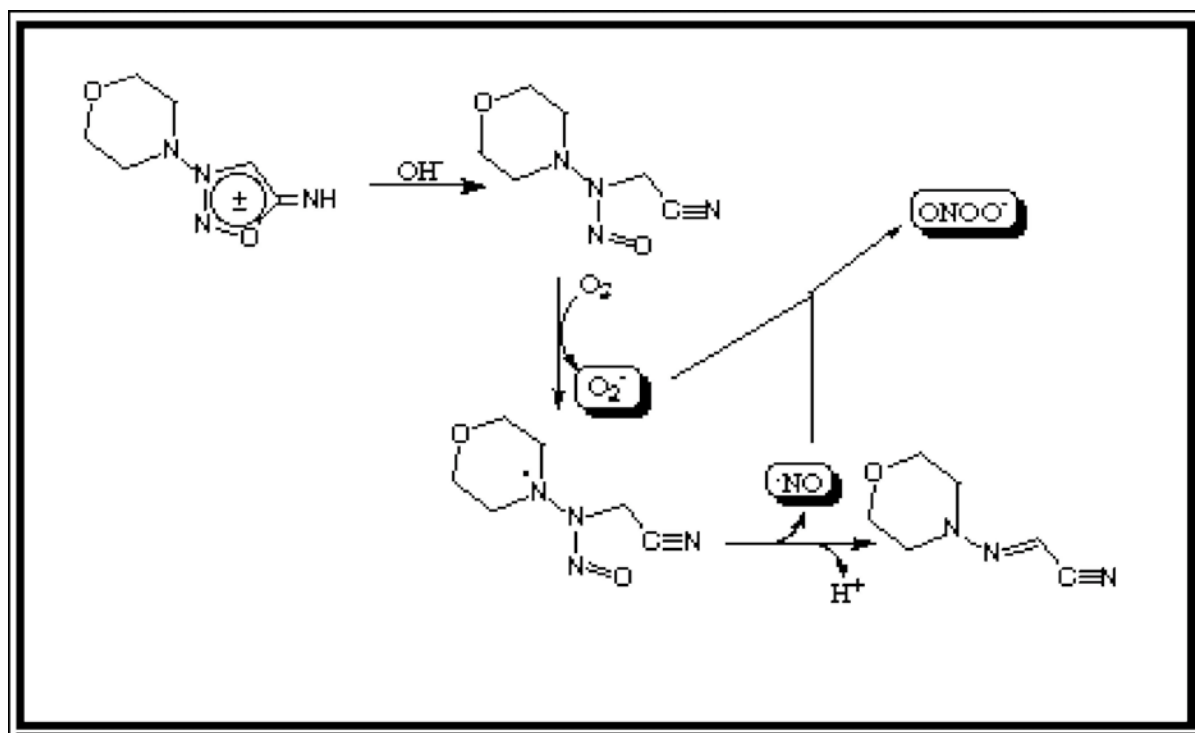
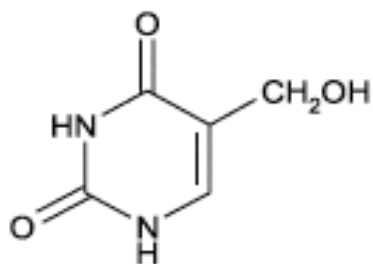
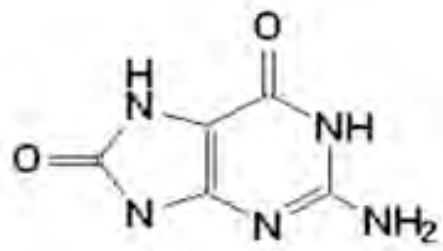


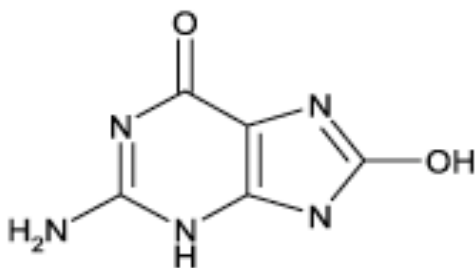
Figure I.13 : Illustration du schéma réactionnel de la formation de peroxynitrite à partir du **SIN-1** (<http://www.dojindo.com/newsletter/SIN1-2.gif>).



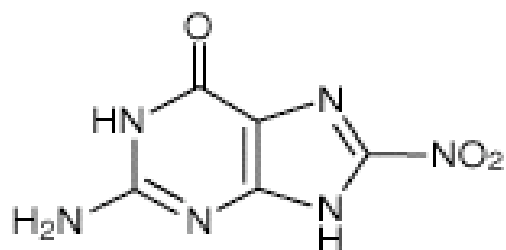
a



b



c



d

Figure I.14: Modifications des bases de l'ADN induits par le peroxynitrite. Formation de 8-hydroxyguanine (a.), 8-(hydroxyméthyl)uracil (b.), 8-oxoguanine (c.) et de 8-nitroguanine (d.) (<http://www.axxora.com/files/formula/ALX-480-091.gif>; <http://www.anadev.com/images/produit91.gif>; <http://www.weizmann.ac.il/Livneh/images/resimages/2c05.jpg>; <http://www.biolog.de/images/N003.gif>)

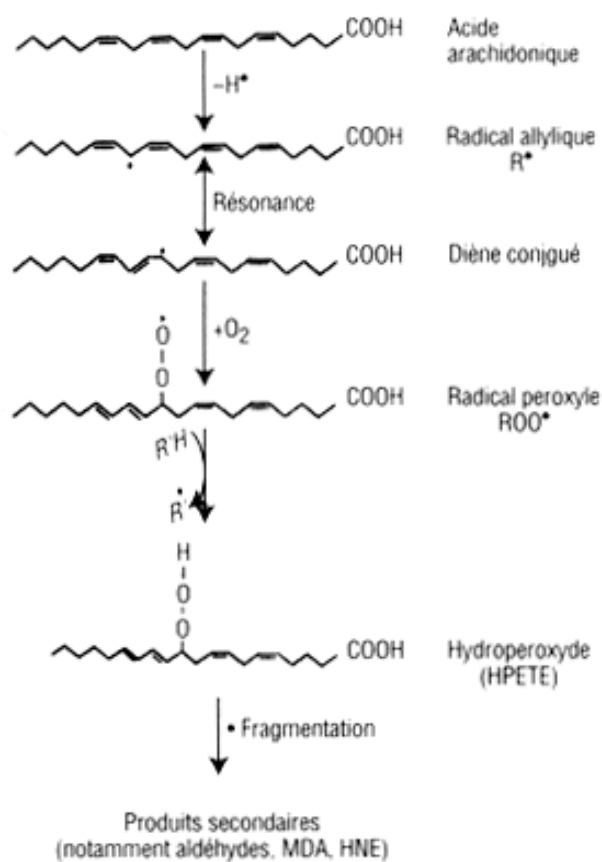
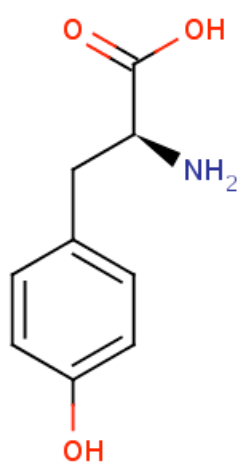
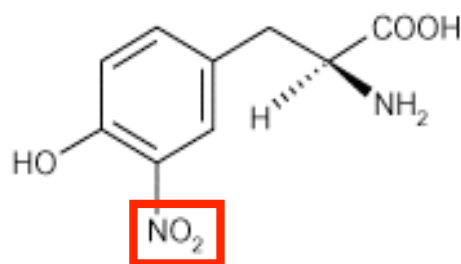


Figure I.15 : Schéma réactionnel de la peroxydation lipidique illustré pour l'acide arachidonique. Le peroxynitrite réagit avec l'acide arachidonique qui est transformé en hydroperoxyde lipidique. La fragmentation de cet hydroperoxyde peut donner lieu à la formation de produits secondaires tels que des aldéhydes à courte chaîne possédant des activités chimiques et biologiques élevées. De plus, la fragmentation des hydroperoxydes lipidiques est favorisée par le stress oxydant (<http://www.nsfa.asso.fr/IMG/gif/oxydarachidonic.gif>).



Tyrosine



3-nitrotyrosine

Figure I.16 : Effets du peroxynitrite sur la nitration des protéines sur le résidu tyrosine. Structure de la tyrosine et de la 3-nitrotyrosine.
<http://www.eppendorfn.com/applications/images/molecularstructure/tyrosine.gif>;
<http://www.caymanchem.com/images/catalog/89540.gif>)

Enzyme	Modified residue	Reference
ATPase ^b	ND ^a	(Radi et al., 1994)
Succinate dehydrogenase ^b	ND	(Radi et al., 1994 ; Rubbo et al., 1994)
Fumarate reductase (<i>Trypanosoma cruzi</i>) ^b	ND	Rubbo et al., 1994
NADH :ubiquinone oxidoreductase ^b	ND	(Radi et al., 1994 ; Rioboet al., 2001)
Cytochrome P450 BM-3 ^c	Cys, Tyr	(Daiber et al., 2000)
Cytochrome P450 2B1 ^c	Tyr	(Roberts et al., 1998)
Prostacycline synthase ^{b,c}	Tyr	(Zou et Ullrich, 1996 ; Zou et al., 1997)
Inductible nitric oxide synthase ^c	Heme	(Huhmer et al., 1997)
Glutathione peroxidase ^{b,c}	Selenocysteine	(Asahi et al., 1997 ; Briviba et al., 1998 ; Padmaja et al., 1998 ; Fu et al., 2001)
Alcohol dehydrogenase ^c	Zinc sulfur cluster	(Crow et al., 1995)
Aconitase ^{b,c}	Iron sulfur cluster	(Castro et al., 1994 ; Hausladen et Fridovich, 1994 ; Keyer et Imlay, 1997 ; Castro et al., 1998)
6-Phosphogluconate dehydratase ^b	Iron sulfur cluster	(Keyer et Imlay, 1997)
Fumarase A ^b	Iron sulfur cluster	(Keyer et Imlay, 1997)
Creatine kinase ^{b,c}	Cys	(Konorev et al., 1998 ; Stachowiak et al., 1998)
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ^{b,c}	Cys	(Souza et Radi, 1998 ; Keyer et Imlay, 1997)
Glutamine synthetase ^c	Tyr, Met	(Berlett et al., 1998)
Succinyl-CoA :3-oxoacid CoA transferase ^b	Tyr	(Marcondes et al., 2001)
Mn superoxide dismutase ^{b,c}	Tyr	(MacMillan-Crow et al., 1996)
Cu,Zn superoxide dismutase ^c	His	B. Alvarez et al., manuscript in preparation
Tyrosine hydroxylase ^{b,c}	Tyr, Cys	(Ara et al., 1998 ; Kuhn et al., 1999 ; Blanchard-Fillion et al., 2001)
Tryptophan hydroxylase ^c	Cys	(Kuhn et Geddes, 1999)
Ca ²⁺ -ATPase ^b	Cys	(Viner et al., 1996 ; Klebl et al., 1998)
Caspase 3 ^{b,c}	Cys	(Haendeler et al., 1997)
Protein tyrosine phosphatase ^c	Cys	(Takakura et al., 1999)
Nicotinamide nucleotide transhydrogenase ^b	Tyr	(Forsmark-Andree et al., 1996)
Ribonucleotide reductase ^c	Tyr	(Guittet et al., 1998)
Zn ²⁺ -glycerophosphocoline cholinephosphodiesterase ^c	Tyr	(Sok, 1998)
NADPH-cytochrome P450 reductase ^c	ND	(Sergeeva et al., 2001)
Glutathione reductase ^c	Tyr	(Francescutti et al., 1996 ; Savvides et al., 2002)
Glutathione-S-transferase ^{b,c}	ND	(Wong et al., 2001)
Glutaredoxin ^b	ND	(Aykan-Toker et al., 2001)
Protein kinase C ^{b,c}	Tyr	(Knapp et al., 2001)
Ornithine decarboxylase ^{b,c}	Tyr	(Seidel et al., 2001)
Xanthine oxidase ^c	Molybdenum center	(Houston et al., 1998 ; Lee et al., 2000)
Lysozyme ^c	Trp	B. Alvarez et al., unpublished

^aND : not determined, ^benzyme in cell extracts, *ex vivo* or *in vivo* systems, ^cpurified enzyme

Tableau I.1 : Tableau reprenant les diverses modifications induites par le peroxynitrite sur diverses enzymes (Alvarez and Radi 2003).



Figure I.17 : Représentation schématique des domaines caractérisant les 3 isoformes de Nrf (Jaiswal 2004).

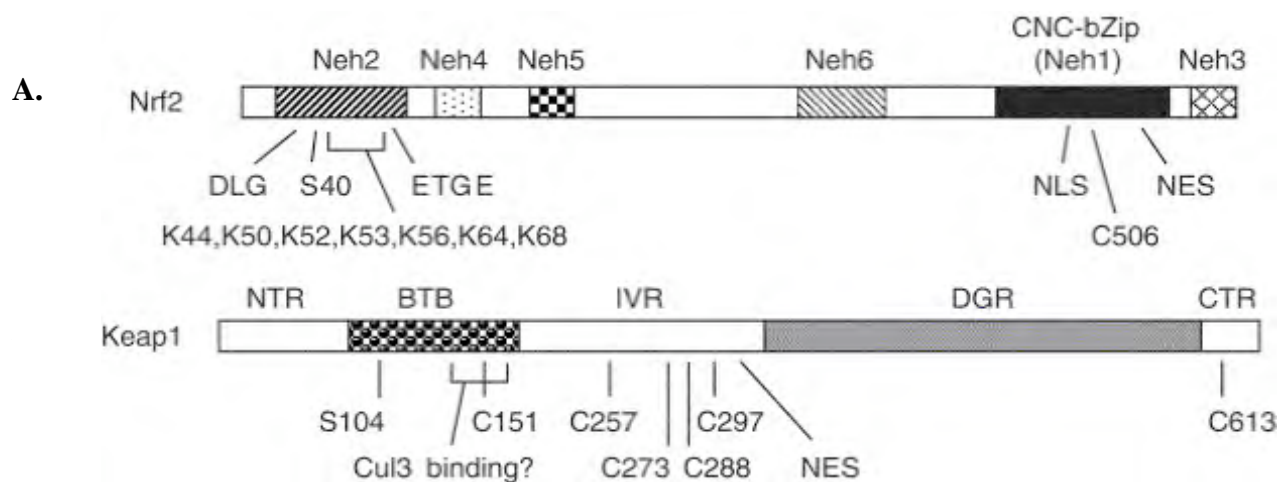


Figure I.18 : Représentation des domaines fonctionnels de Nrf2 et de KEAP1. **A.** KEAP1 se lie à Neh2 grâce aux motifs ETGE et DLG. Sept résidus lysines se trouvent entre ces deux motifs, ces résidus lysines sont important dans l'ubiquitinylation de Nrf2. Neh4 et Neh5 sont les domaines d'activation transcriptionnelle interagissant avec CBP (CREB Binding Protein). Les domaines Neh6 et Neh2 sont impliqués dans la dégradation de Nrf2. Le domaine Neh1 contient une structure bZIP qui est importante pour la liaison à l'ADN et la dimérisation avec les petites protéines Mafs. Ce domaine contient également un site NLS (Nuclear Localisation Signal) et un site NES (Nuclear Export Signal). **B.** Le domaine DGR permet la liaison de KEAP1 à Nrf2 et à l'actine. Cul3 interagit avec les domaines IVR et BTB. Le domaine BTB est très important pour la dimérisation de KEAP1 avec Nrf2. Le domaine IVR contient un site NES (Kobayashi and Yamamoto 2006).

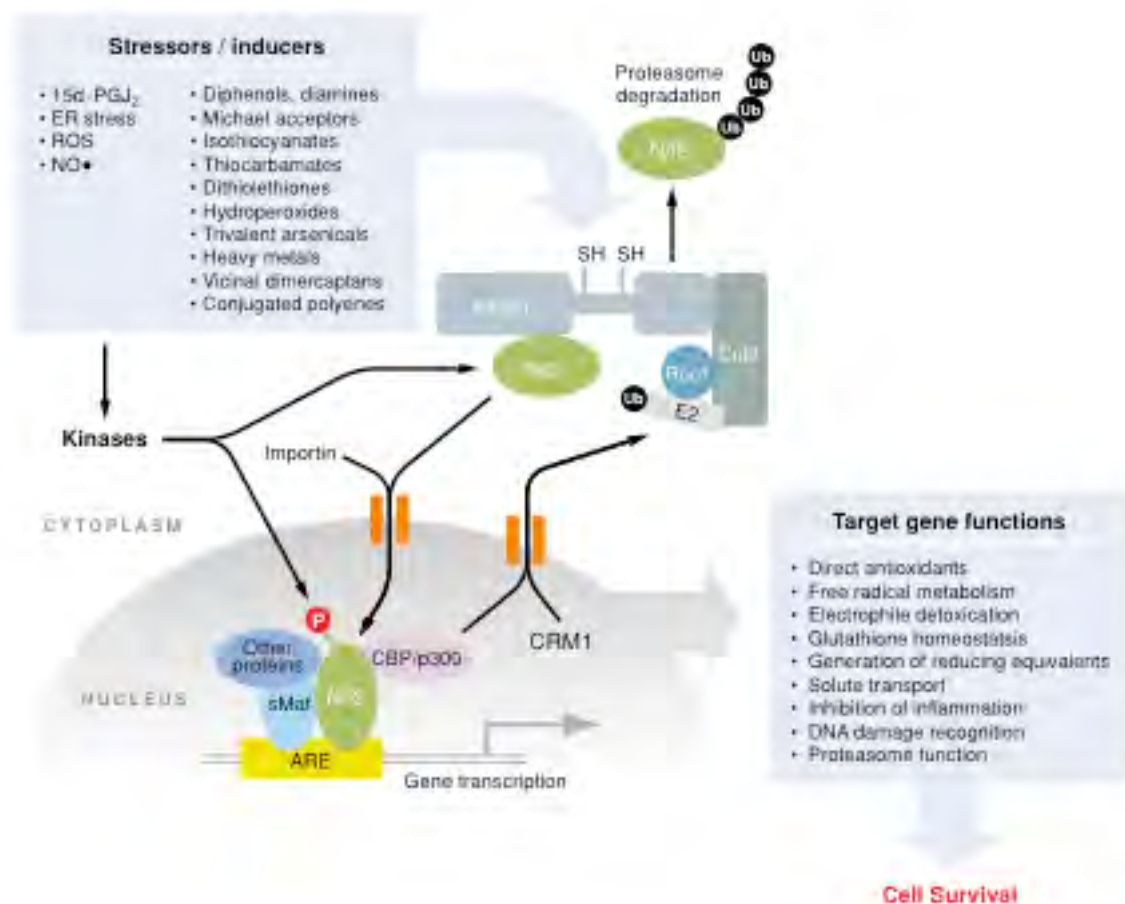


Figure I.19 : Schéma général de l'induction de l'expression génique de la voie de signalisation KEAP1-Nrf2-ARE. Il existe toute une série d'agents de stress ou inducteurs qui peuvent activer la voie de Nrf2. Ces agents disruptent l'association de Nrf2 avec KEAP1. Nrf2 peut alors se transloquer dans le noyau où il interagit avec d'autres facteurs de transcription et protéines de la machinerie de transcription afin de permettre la transactivation des gènes ARE-dépendants (Kensler, Wakabayashi et al. 2007).

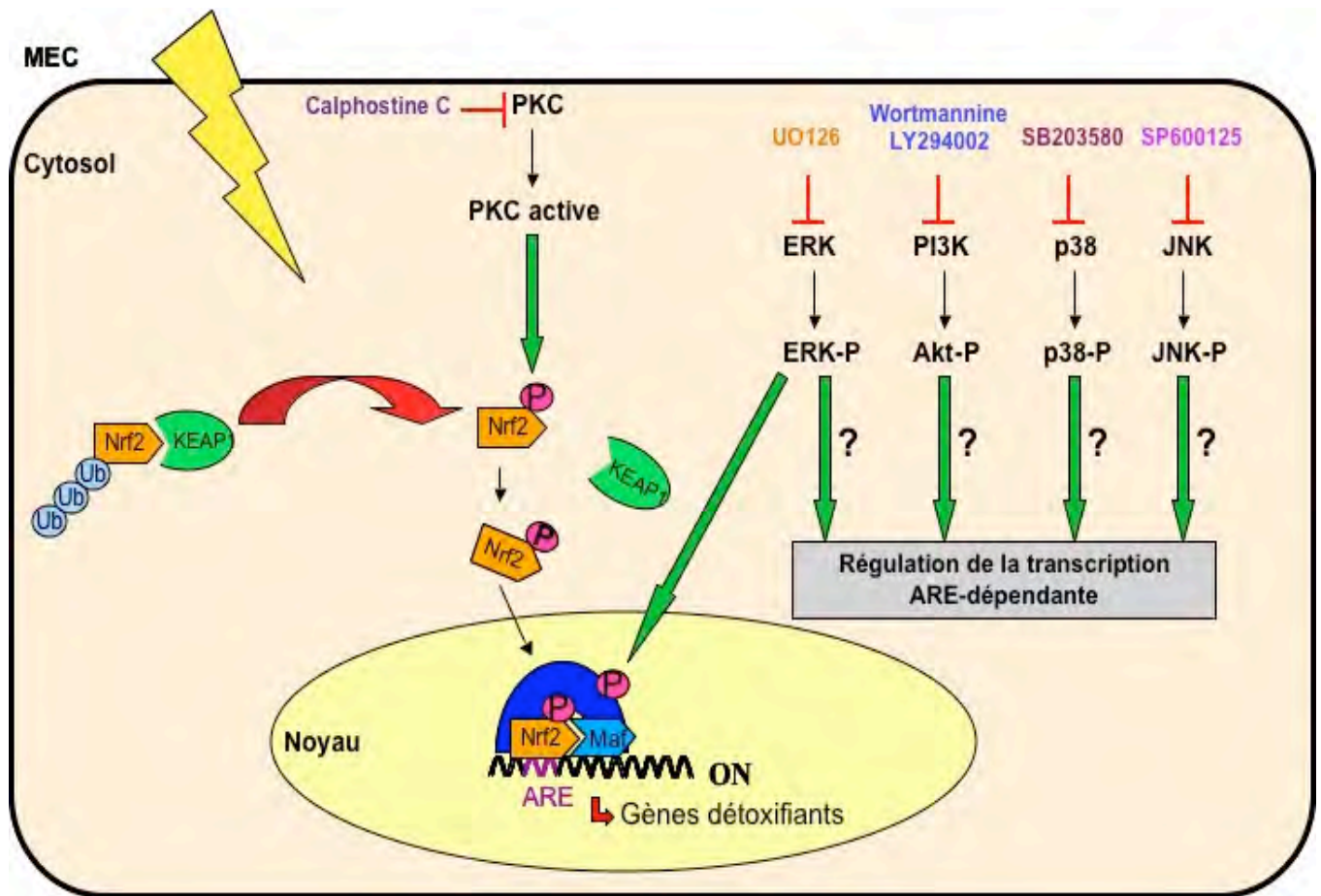
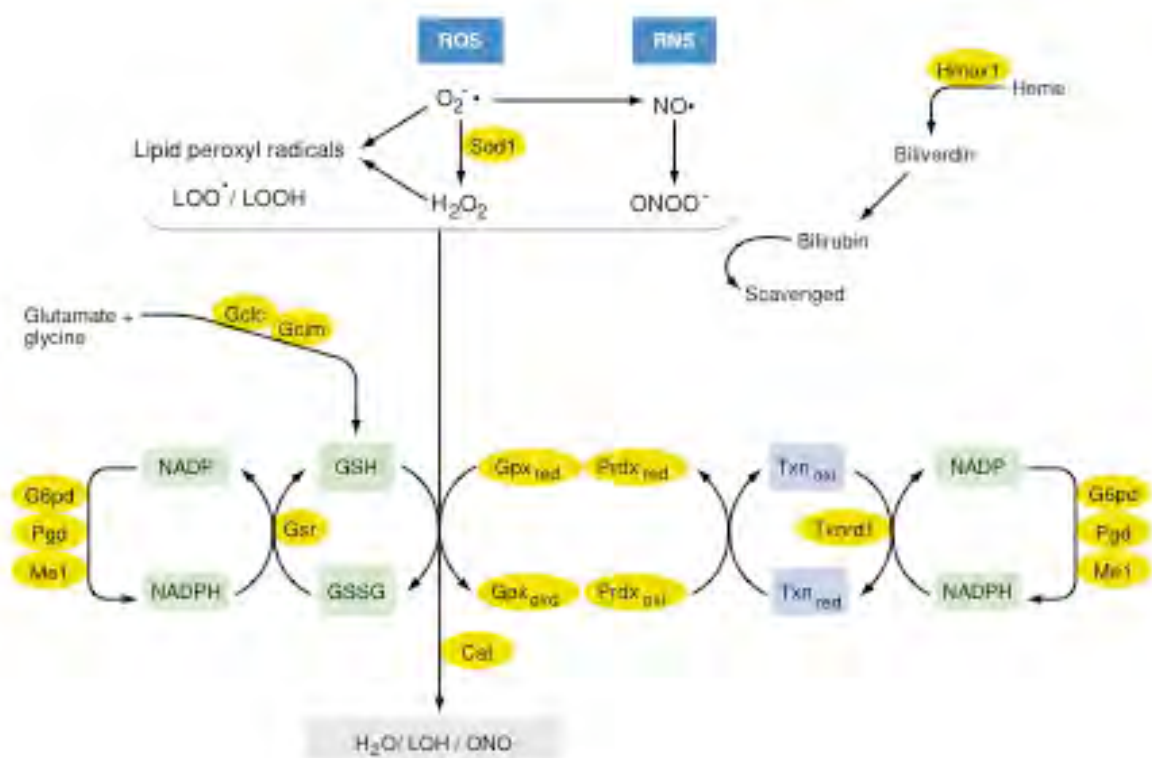


Figure I.20 : Schéma de la voie de signalisation pour l'activation de Nrf2 et de l'expression de gènes ARE-dépendant. En conditions physiologiques normales, Nrf2 est séquestré dans le cytosol par KEAP1. Lors d'un stress oxydant, il y aurait oxydation des résidus cystéines de KEAP1, d'où un changement de conformation de KEAP1 permettant ainsi la libération de Nrf2. Nrf2 est alors transloqué dans le noyau. La voie de la PKC phosphorylerait Nrf2. De plus, La voie des MAPK stimulerait la transactivation des gènes cibles de Nrf2 par la phosphorylation du co-activateur CBP/p300 (Cullinan, Zhang et al. 2003).



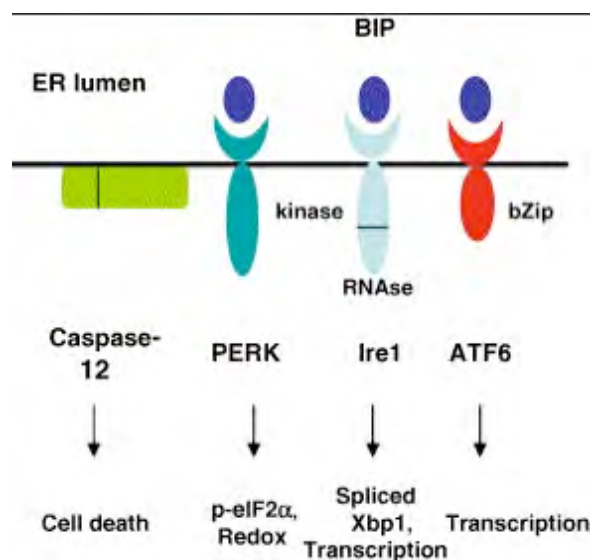


Figure I.22 : Représentation schématique des protéines transmembranaires du RE impliquées dans l'UPR. En conditions physiologiques normales, la protéine chaperonne BiP est liée aux protéines transmembranaires PERK, Ire1 et ATF6. La caspase 12 (murine) ou caspase 4 (humaine) réside également en membrane du RE. Lors d'un stress oxydant, les protéines PERK, Ire1 et ATF6 sont libérées de BiP. Elles peuvent alors induire leur voie de signalisation. Si le stress oxydant excède la capacité de repliement du RE, il en résulte l'activation de la voie apoptotique passant par la caspase 12 chez la souris et la caspase 4 chez l'Homme (Cullinan and Diehl 2006).

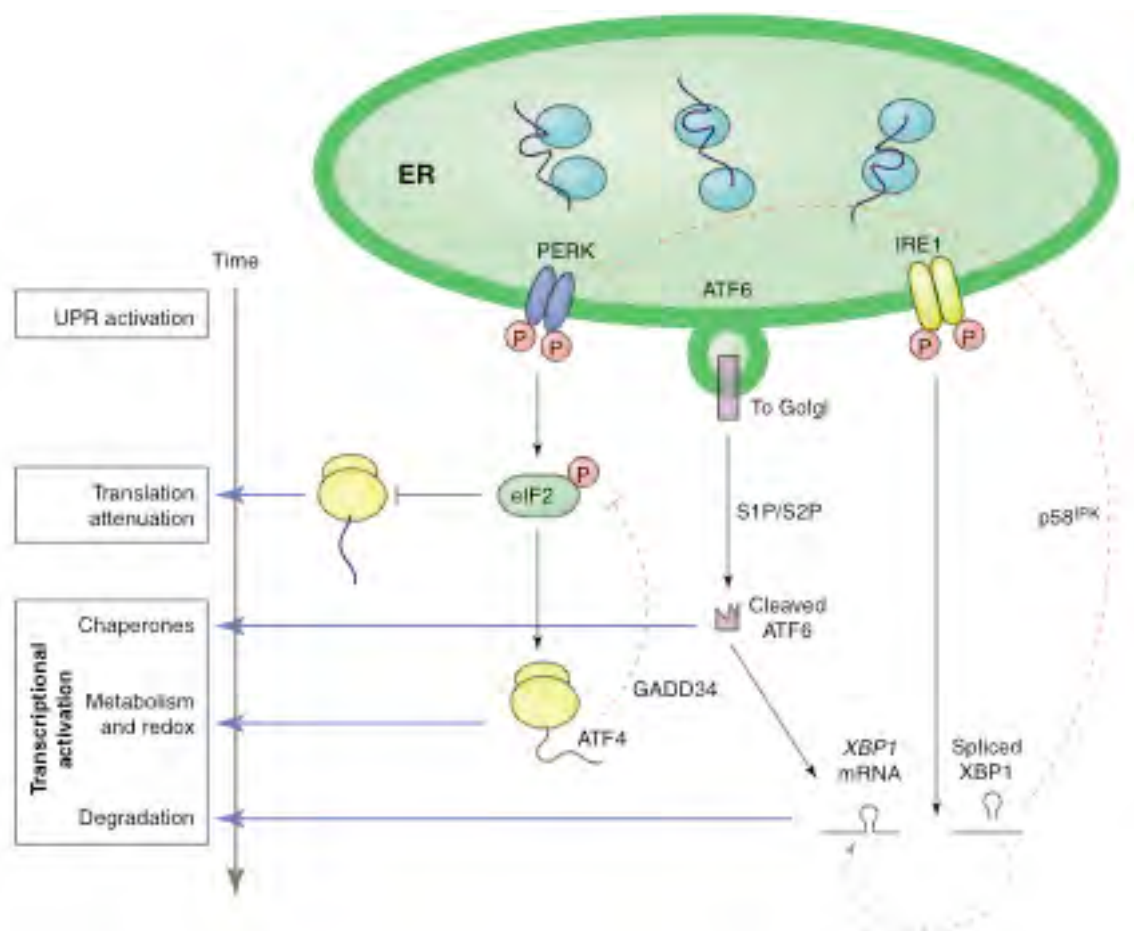


Figure I.23 : Représentation schématique de l'UPR reprenant les 3 voies de signalisation liées aux protéines PERK, ATF6 et IRE1 avec les réponses qu'elles contrôlent. Lorsque la protéine kinase PERK est libérée de BiP, elle phosphoryle eIF2 α . Ce qui résulte en l'inhibition générale de la traduction des ARNm. Cependant, les ARNm d'ATF4 échappent à cette régulation. Lorsque ATF6 est libéré de BiP, il est d'abord transloqué dans le Golgi où il sera clivé par S1P et S2P. ATF6 clivé peut alors se transloquer dans le noyau afin d'induire notamment la transcription de XBP-1. Enfin, lorsque IRE1 est libéré de BiP, il se dimérise et s'autophosphoryle afin de permettre le « splicing » de l'ARNm de XBP-1 (Rutkowski and Kaufman 2004).

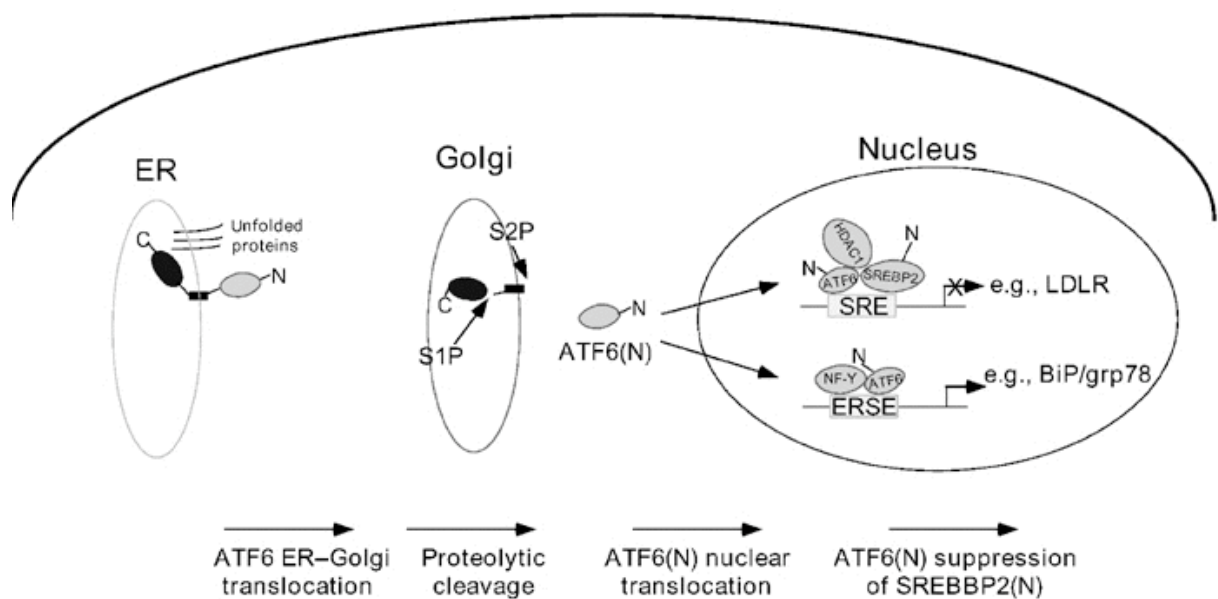


Figure I.25 : Représentation schématique de la voie de signalisation d'ATF6 dans l'UPR. Lorsque ATF6 est libéré de BiP, il est transloqué dans l'appareil de Golgi où il va subir deux clivages. Le fragment cytosolique ainsi libéré migre vers le noyau pour activer la transcription des gènes cibles de la voie UPR (<http://www.nature.com/emboj/journal/v23/n4/images/7600106f8.jpg>).

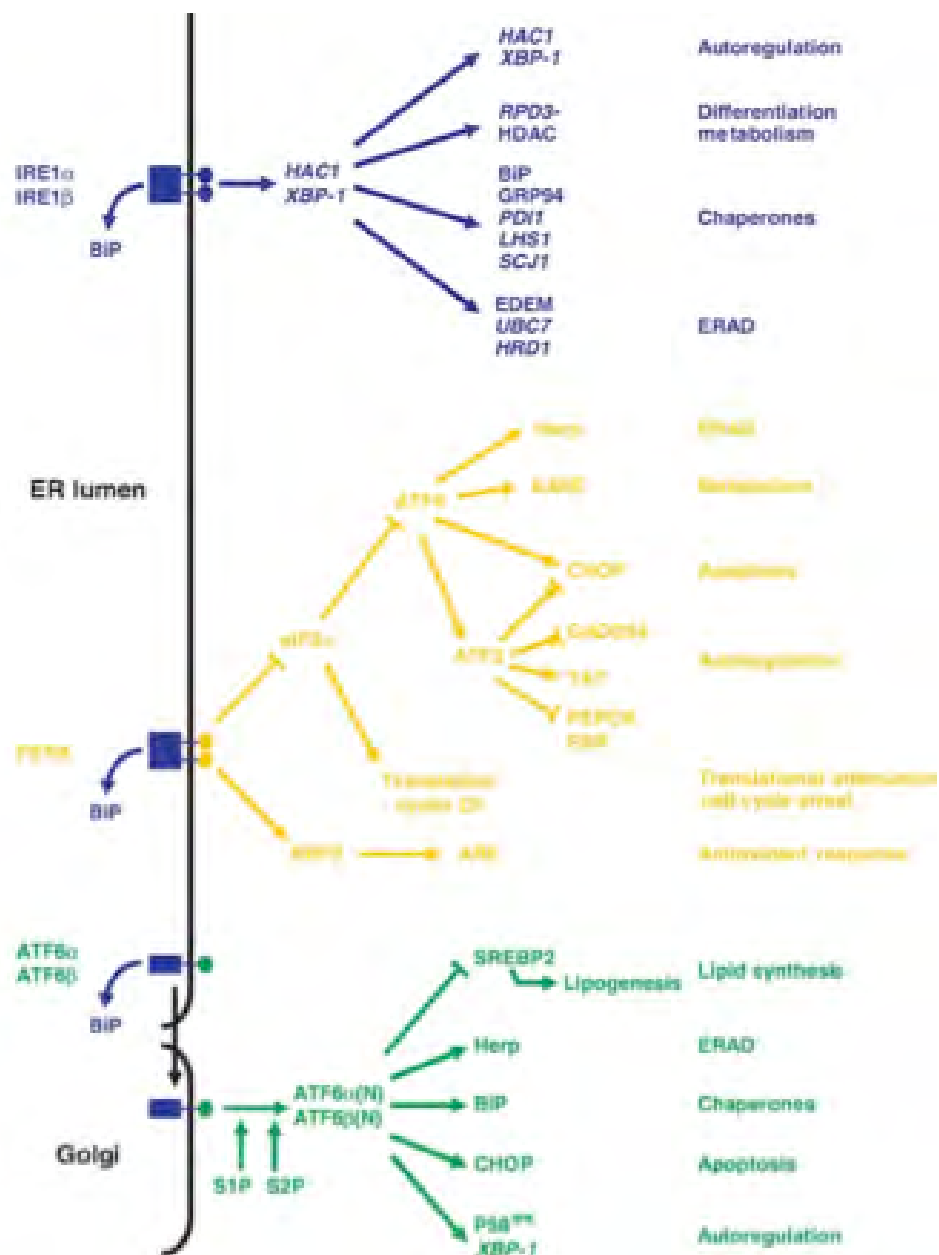


Figure I.26 : Représentation des différentes voies impliquées dans la protection des cellules en réponse à un stress oxydant au niveau du RE (Schroder and Kaufman 2005).

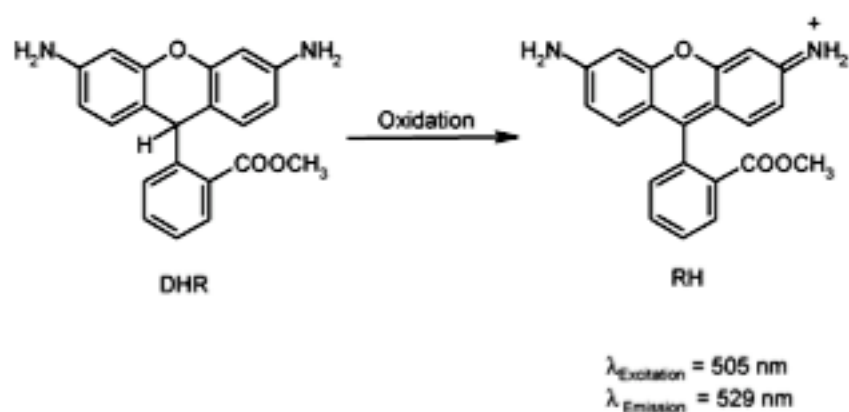


Figure I.27 : Oxydation de la dihydrorhodamine 123 en rhodamine 123 (Gomes, Fernandes et al. 2006).

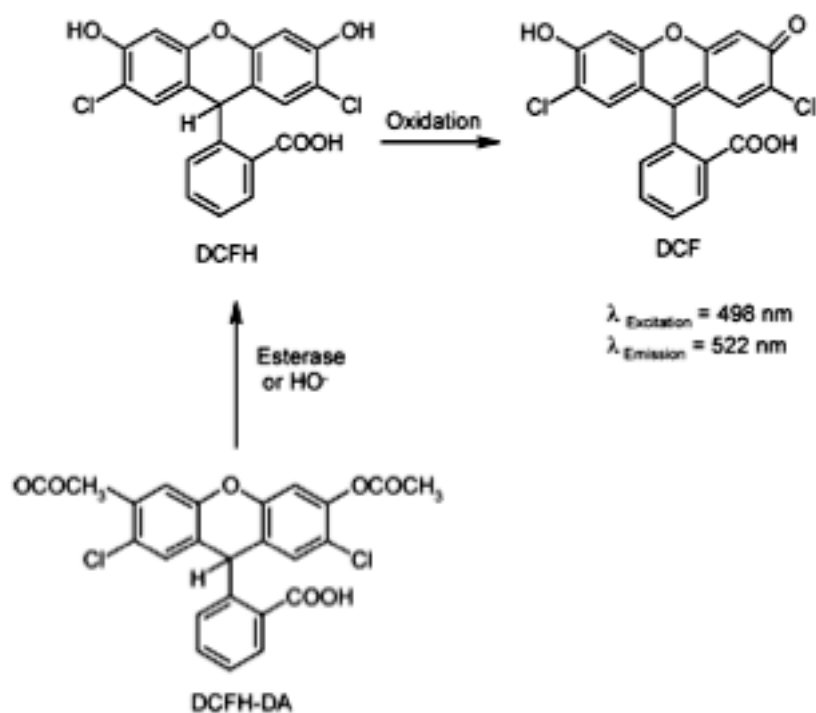


Figure I.28 : La sonde 2,7-dichlorodihydrofluorescéine diacétate (DCFH-DA) traverse les membranes cellulaires et est hydrolysée par les estérases intracellulaires en DCFH. Puis la sonde DCFH est oxydée par exemple par le peroxy-nitrite en DCF (Gomes, Fernandes et al. 2006).

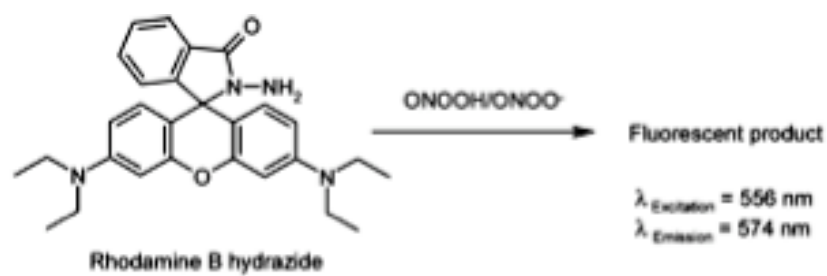


Figure I.29 : Oxydation de l'hydrazide de rhodamine B par le peroxynitrite (ONOO^-) ou l'acide peroxynitreux (ONOOH) (Gomes, Fernandes et al. 2006).

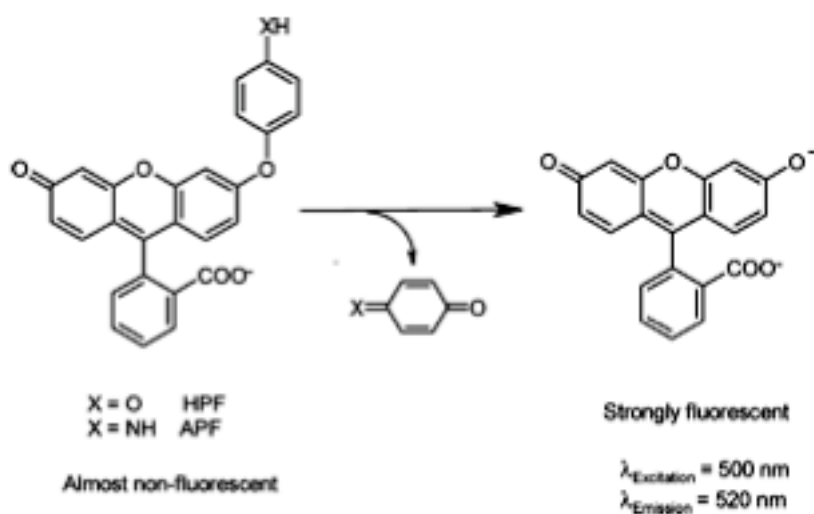
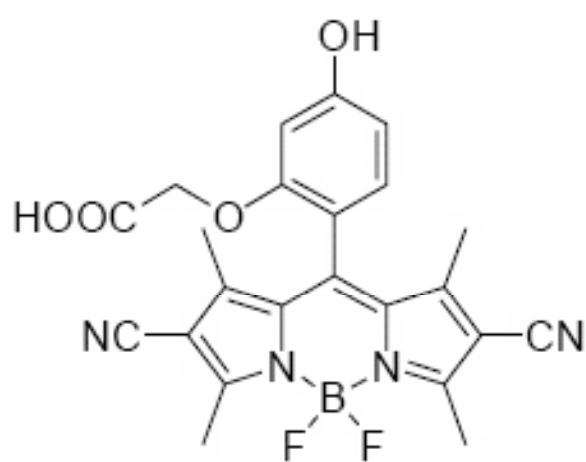


Figure I.30 : Structure des sondes HPF et APF. Les sondes HPF et APF oxydées par le peroxynitrite deviennent hautement fluorescentes (Gomes, Fernandes et al. 2006).



NiSPY-3

Figure I.31 : Structure de la sonde NiSPY-3 (Ueno, Urano et al. 2006).

- Alvarez, B. and R. Radi (2003). "Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins." Amino Acids **25**(3-4): 295-311.
- Cai, H. and D. G. Harrison (2000). "Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress." Circ Res **87**(10): 840-4.
- Cohen, R. A. and T. Adachi (2006). "Nitric-oxide-induced vasodilatation: regulation by physiologic s-glutathiolation and pathologic oxidation of the sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase." Trends Cardiovasc Med **16**(4): 109-14.
- Cullinan, S. B. and J. A. Diehl (2006). "Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway." Int J Biochem Cell Biol **38**(3): 317-32.
- Cullinan, S. B., D. Zhang, et al. (2003). "Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival." Mol Cell Biol **23**(20): 7198-209.
- Forstermann, U. and T. Munzel (2006). "Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace." Circulation **113**(13): 1708-14.
- Gomes, A., E. Fernandes, et al. (2006). "Use of fluorescence probes for detection of reactive nitrogen species: a review." J Fluoresc **16**(1): 119-39.
- Govers, R. and T. J. Rabelink (2001). "Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase." Am J Physiol Renal Physiol **280**(2): F193-206.
- Jaiswal, A. K. (2004). "Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression." Free Radic Biol Med **36**(10): 1199-207.
- Kensler, T. W., N. Wakabayashi, et al. (2007). "Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 89-116.
- Kobayashi, M. and M. Yamamoto (2006). "Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species." Adv Enzyme Regul **46**: 113-40.
- Murphy, R. and T. E. DeCoursey (2006). "Charge compensation during the phagocyte respiratory burst." Biochim Biophys Acta **1757**(8): 996-1011.
- Rutkowski, D. T. and R. J. Kaufman (2004). "A trip to the ER: coping with stress." Trends Cell Biol **14**(1): 20-8.
- Schroder, M. and R. J. Kaufman (2005). "The mammalian unfolded protein response." Annu Rev Biochem **74**: 739-89.
- Taniyama, Y. and K. K. Griendling (2003). "Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms." Hypertension **42**(6): 1075-81.
- Ueno, T., Y. Urano, et al. (2006). "Mechanism-based molecular design of highly selective fluorescence probes for nitrative stress." J Am Chem Soc **128**(33): 10640-1.
- Valko, M., D. Leibfritz, et al. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol **39**(1): 44-84.
- Yamamoto, T. and R. J. Bing (2000). "Nitric oxide donors." Proc Soc Exp Biol Med **225**(3): 200-6.
- Yoshida, H. (2007). "ER stress and diseases." Febs J **274**(3): 630-58.

I. Introduction

1. L'endothélium

La paroi des vaisseaux sanguins est constituée de trois couches distinctes : l'intima, la média et l'adventice.

L'endothélium vasculaire, reposant sur une membrane basale, est la couche la plus interne des vaisseaux sanguins en contact avec le sang et il forme avec la subendothéliale l'intima. L'endothélium a une activité sécrétoire importante et assure de nombreuses fonctions, à savoir un rôle de filtre moléculaire au niveau de la barrière sang/tissu, la régulation des échanges liquidiens, de la vasomotricité, de la mitogenèse et de l'angiogenèse. Il constitue une barrière aux antigènes et participe à la réaction immunitaire; il contrôle la coagulation sanguine en participant à la fois à l'hémostase et à la fibrinolyse; il exerce également un rôle prépondérant dans le contrôle du tonus vasculaire, de l'inflammation et du stress oxydant en plus de moduler la diapédèse des leucocytes ainsi que la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses, conduisant au processus d'athérosclérose (Griendling and Alexander 1996).

La média est constituée principalement de muscle lisse renforcé par des couches organisées de fibres élastiques ; très développée dans les artères, elle devient peu perceptible dans les veines et elle est quasi inexistante dans les vaisseaux de petit calibre et les capillaires sanguins.

Enfin, l'adventice est la couche externe de la paroi vasculaire. Il s'agit de la couche la plus développée des veines. Elle est surtout composée de tissu conjonctif, de collagène, mais on peut également y retrouver des cellules musculaires lisses, des nerfs ainsi que de petits vaisseaux sanguins formant un réseau appelé vasa vasorum (**figure I.1**).

1.1. Les cellules endothéliales

L'endothélium vasculaire constitue donc une interface sang/tissus et une barrière sélective qui diffère selon sa localisation. Il participe également au contrôle de la vasomotricité en synthétisant et en libérant de nombreux facteurs, qui interviennent dans la régulation du tonus vasculaire, la croissance cellulaire, l'hémostase et l'inflammation. Les cellules endothéliales au repos possèdent un phénotype plutôt anti-thrombotique, anti-inflammatoire et anti-agrégant. Elles renferment les corps de Weibel-Palade qui permettent le stockage du facteur de Von Willebrand et de la P-sélectine.

Le **facteur de Von Willebrand** est une glycoprotéine synthétisée par les cellules endothéliales et les plaquettes, stockée respectivement dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales et les granules α des plaquettes. On peut aussi le retrouver dans le plasma et dans la sous-endothéliale. Il joue un rôle important dans l'hémostase, participant d'une part, à l'adhérence des plaquettes à la paroi vasculaire lésée et d'autre part, aux mécanismes d'agrégation plaquettaire en stabilisant le facteur VIII.

La **P-sélectine** est quant à elle une protéine membranaire qui contribue à l'entrée des leucocytes dans le tissu enflammé, par interaction avec des récepteurs leucocytaires. Cette interaction est critique dans le « rolling » ou enroulement leucocytaire, première étape de la diapédèse.

Lors d'un changement de l'environnement de la cellule endothéliale, celle-ci peut être activée et son phénotype va changer. Il y a alors exocytose des corps de Weibel-Palade permettant ainsi l'expression en membrane de la P-sélectine et la libération du facteur de Von Willebrand.

De plus, afin de maintenir un phénotype anti-thrombotique, les cellules endothéliales produisent de l'oxyde nitrique qui est synthétisé à partir de l'acide aminé L-arginine et de l'oxygène par la NO synthase constitutive des cellules endothéliales.

L'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS ou NOS 3) est une enzyme qui possède un domaine réductase du côté C-terminal et un domaine oxygénase du côté N-terminal (**figure I.2**). L'extrémité C-terminale de la protéine lie le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), la flavine mononucléotide (FMN) et la flavine adénine dinucléotide (FAD). Le côté N-terminal porte un groupement prosthétique hème. Ce domaine lie également la 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (BH₄), l'oxygène, la calmoduline et la L-arginine. Le NADPH réduit les flavines, mais le transfert de l'électron jusqu'à l'hème ne se passe que si des ions calcium sont liés à la calmoduline. La eNOS est activée sous forme dimérique ; chaque dimère contient un ion Zn, qui stabilise le dimère. La synthèse de l'oxyde nitrique se passe en deux étapes. Dans un premier temps, la eNOS hydroxyle la L-arginine en N-hydroxy-L-arginine; dans un deuxième temps, la eNOS oxyde la N-hydroxy-L-arginine en L-citrulline et en oxyde nitrique (**figure I.3**). La régulation de l'activité enzymatique de la eNOS est plus complexe que pour les autres isoformes de NOS, la nNOS, exprimée dans les cellules nerveuses et la iNOS (NOS inductible) exprimée entre autres dans les cellules musculaires lisses (**figure I.2**). En effet, la eNOS subit plusieurs modifications co- ou post-traductionnelles : myristoylation, palmitoylation et phosphorylation sur tyrosine et sur sérine (**figure I.4**). Enfin, la localisation cellulaire de la eNOS détermine également son activité. Les données de la littérature montrent que la eNOS est présente au niveau des cavéoles, invaginations particulières de la membrane plasmique, riches en cholestérol. La eNOS associée aux cavéoles est inactive, mais cette association aux cavéoles est indispensable pour l'activation de la eNOS (Forstermann and Munzel 2006).

1.2. Dysfonctionnement endothélial

En conditions physiologiques « normales », l'endothélium maintient le tonus vasculaire et la fluidité sanguine, et il y a peu, voire pas d'expression de facteurs pro-inflammatoires. Cependant, divers facteurs de risque peuvent conduire au dysfonctionnement endothélial (**figure I.5**), caractérisé par un phénotype pro-inflammatoire, accompagné d'un déséquilibre entre des facteurs vasodilatateurs et anti-thrombotiques en faveur des facteurs vasoconstricteurs et pro-thrombotiques. Les cellules endothéliales adoptent alors un phénotype pro-thrombotique avec un risque élevé de problèmes cardiovasculaires. De plus, l'endothélium sécrète des cytokines inflammatoires ainsi que des facteurs chimiotactiques et exprime des molécules d'adhérence afin de recruter les leucocytes (Widlansky, Gokce et al. 2003). L'ensemble de ces changements phénotypiques contribue à ce que l'on appelle le dysfonctionnement endothélial.

Par ailleurs, on voit que plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire favorisent ce dysfonctionnement endothélial, ainsi que la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ou ROS). Parmi ces facteurs de risque, nous retrouvons notamment le tabagisme (Perlstein and Lee 2006), l'hypercholestérolémie (Freeman 2006), l'hypertension (Taniyama and Griendling 2003) et l'hyperglycémie (Taniyama and Griendling 2003).

En effet, il existe de nombreuses données dans la littérature montrant que le **tabagisme** augmente le risque de développer des maladies cardiovasculaires. La fumée de cigarette induit un stress oxydant au niveau de la paroi vasculaire. Les fumeurs ont donc un taux élevé en leucocytes et en marqueurs de l'inflammation incluant notamment l'interleukine-6 (IL-6), la E-sélectine et la P-sélectine. De plus, la cigarette augmente la production d'anions superoxyde par la NADPH oxydase, ainsi que la transcription et l'activité de la xanthine oxydase (Perlstein and Lee 2006).

L'**hypercholestérolémie** constitue également un facteur de risque (Freeman 2006). En effet, des ROS en présence de la paroi vasculaire peuvent induire l'oxydation des LDL et des concentrations élevées en LDL oxydées conduisent à la sous régulation de l'expression de la eNOS via une réduction de la demi-vie de leurs ARNm. La biodisponibilité du NO est alors fortement diminuée et donc il ne peut plus remplir son rôle anti-athérogène et contribue ainsi au dysfonctionnement endothélial (Williams, Wheatcroft et al. 2002; Yokoyama 2004).

Les espèces réactives oxygénées sont également impliquées dans le développement du dysfonctionnement vasculaire des **diabétiques**. L'hyperglycémie et l'augmentation des acides gras libres dans le sang constituent les principales caractéristiques du diabète, conduisant tous deux à la libération d'anions superoxyde provenant de la chaîne respiratoire mitochondriale et de l'activation de la NAD(P)H oxydase (Taniyama and Griendling 2003). En effet, en conditions d'hyperglycémie, il y a augmentation du métabolisme du glucose qui résulte en une augmentation de la production d'anions superoxyde (Johansen, Harris et al. 2005).

Enfin, le système rénine-angiotensine joue un rôle dans la pathogenèse de l'athérosclérose associée à l'**hypertension**. L'angiotensine II active la NADPH oxydase pour produire des anions superoxyde dans les cellules endothéliales et induit l'expression de VCAM-1, ICAM-1 et MCP-1, intégrines et cytokine pro-inflammatoires (Taniyama and Griendling 2003).

On voit donc que le dysfonctionnement endothélial est favorisé lorsqu'il y a surproduction simultanée de ROS et de NO[•], ce qui conduit à la formation d'une molécule particulièrement toxique, le peroxynitrite ou ONOO⁻ (**figures I.6 et I.9**). Nous allons donc passer successivement en revue le NO[•], les ROS et le ONOO⁻ dans le contexte vasculaire dans les paragraphes suivants.

1.3. L'oxyde nitrique et les cellules endothéliales

L'oxyde nitrique (NO[•]), longtemps appelé facteur de relaxation dérivé de l'endothélium (EDRF), le plus puissant vasodilatateur physiologique, est l'un des principaux facteurs vaso-actifs libérés par l'endothélium. Comme déjà mentionné, il est produit par la eNOS, enzyme exprimée de manière constitutive par les cellules endothéliales, mais sous le contrôle strict du complexe Ca²⁺/calmoduline. Une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca²⁺ induite par un agoniste, que ce soit via des mécanismes récepteurs dépendants ou

indépendants, favorise donc une production accrue de NO^\bullet et une vasodilatation (Fleming and Busse 1999). L'expression constitutive de la eNOS est aussi modulée par les forces de cisaillement qui favorisent sa surexpression (Gomes, Fernandes et al. 2006). Le NO^\bullet synthétisé est libéré vers la lumière vasculaire et vers l'espace sous-endothélial, où il exerce ses différentes actions (**figure I.7**).

L'activité cellulaire du monoxyde d'azote passe par deux voies essentielles. La première est celle qui consiste en la production de guanosine monophosphate cyclique intracellulaire (GMPc). En effet, le NO^\bullet diffuse à l'intérieur des cellules musculaires lisses et active la guanylate cyclase qui produit du GMPc à partir de la guanosine triphosphate (GTP). L'augmentation intracellulaire du GMPc régule l'activité des protéines contractiles à travers la régulation des kinase et phosphatase de la chaîne légère de la myosine (MLCK et MLCP) (**figure I.8**). Le NO^\bullet favorise aussi la capture des ions calcium par le réticulum sarcoplasmique, ce qui favorise également la relaxation des cellules musculaires lisses (Korhonen, Lahti et al. 2005). Cette relaxation provoque une vasodilatation, un accroissement du débit sanguin et une diminution de l'agrégation des plaquettes sanguines. Le NO^\bullet possède en outre des propriétés anti-athérosclérotiques, car il interfère aussi avec l'adhérence des monocytes et des leucocytes à l'endothélium, diminue la perméabilité endothéliale, réduit le tonus vasculaire et enfin, il inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses. Mais le NO^\bullet peut aussi agir en contribuant à la production de peroxynitrite, en se combinant avec les ions O_2^- , ce qui est le cas lors d'une surproduction simultanée de NO^\bullet et de O_2^- (**figure I.6**), souvent associée à certains facteurs de risque cardiovasculaire comme décrit au point 1.2 de l'introduction. En outre, le peroxynitrite oxyde à son tour le BH_4 , cofacteur essentiel de la eNOS et peut modifier l'enzyme au point qu'elle se mette à produire des ions O_2^- , ce qui accentue encore le stress oxydatif. On parle de découplage de la eNOS, puisque la réduction de l' O_2 est découplée de la production de NO^\bullet .

La bioactivité du NO^\bullet endothélial est donc déterminée par la balance entre la synthèse et l'inactivation de la molécule d'oxyde nitrique. La production de NO^\bullet par les cellules endothéliales est régulée à trois niveaux différents, à savoir l'expression génique de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS), l'activité enzymatique de la eNOS et l'inactivation du NO^\bullet . Un déséquilibre entre ces trois mécanismes peut être à l'origine du dysfonctionnement endothélial (Yang and Ming 2006). De plus, dans des conditions inflammatoires, l'iNOS des cellules musculaires lisses est induite et produit de grandes quantités de NO^\bullet , contribuant à favoriser la production de peroxynitrite toxique.

1.4. Espèces réactives oxygénées (ROS)

Le terme d'espèces réactives oxygénées au sens large reprend principalement les radicaux libres tels que l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (OH^\bullet); les espèces non-radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'ozone (O_3) et l' O_2 singulet. Les ROS sont des molécules très instables et donc très réactives; leur durée de vie est très brève, cela va de quelques nanosecondes à quelques millisecondes. Nous classerons plutôt le peroxynitrite dans les RNS (ou reactive nitrogen species).

Les espèces réactives oxygénées peuvent être produites par diverses sources. Elles peuvent être générées par l'environnement externe, notamment par les ultraviolets (UV), le rayonnement visible, les rayons X, les rayons γ , l'ozone mais aussi les polluants générés par l'homme, les émissions de gaz d'échappement des véhicules, la cigarette, pour n'en citer que

quelques uns. Mais elles peuvent aussi être générées par l'environnement cellulaire comme par exemple, le métabolisme mitochondrial, l'activation des neutrophiles ainsi que l'activation de voies impliquées dans les processus d'oxydation. La **figure I.9** reprend les principales sources de ROS dans la cellule, avec les systèmes correspondants de détoxification, enzymatiques ou non.

Lors du métabolisme aérobie normal, la molécule d'oxygène est l'accepteur final des électrons provenant de la chaîne respiratoire, ce qui permet la réduction de l'oxygène en eau. Cependant, il peut y avoir une réduction incomplète de l'oxygène, ce qui donne naissance à plusieurs types de ROS suivant que l'oxygène gagne un, deux ou trois électrons. De plus, certaines enzymes peuvent générer des ROS, c'est le cas de la myéloperoxydase qui peut former des ions hypochlorites et des radicaux tyrosyls, et la xanthine oxydase peut former l'anion superoxyde pour ne citer que quelques exemples.

Dans le contexte vasculaire, ce sont les ions $O_2^{\cdot -}$ qui constituent les ROS les plus importants. Ils sont formés par la réduction univalente de l' O_2 , catalysée entre autres par la xanthine oxydase (XO) et par le complexe de la NAD(P)H oxydase (**figure I.10**) (Bonetti, Lerman et al. 2003).

La **xanthine oxydoréductase** est une enzyme qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et qui de plus catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique. La xanthine oxydoréductase existe sous deux formes interconvertibles, soit comme xanthine déshydrogénase, soit en tant que xanthine oxydase. Les 2 formes catalysent les mêmes réactions d'oxydation évoquées ci-dessus, mais la xanthine oxydase réduit l'oxygène moléculaire O_2 , avec production d' H_2O_2 , tandis que la xanthine déshydrogénase préfère utiliser le NAD^+ comme accepteur d'électrons. En conditions de stress oxydant, la xanthine oxydoréductase génère d'autant plus d'anions superoxyde $O_2^{\cdot -}$.

Les **NAD(P)H oxydases** génèrent également des anions superoxyde en utilisant du NADH ou du NADPH comme substrat (Cai and Harrison 2000). Il s'agit d'enzymes multimériques, comprenant des sous-unités impliquées dans les transferts d'électrons (gp91phox, nox1, nox4,...) et des sous-unités régulatrices (p47phox, p67phox, rac1,...). Les profils d'expression de ces sous-unités varient dans le système vasculaire. Les NAD(P)H oxydases jouent un rôle important dans le contexte vasculaire, parce qu'elles répondent de manière très sensibles à certains agonistes tels que l'angiotensine II (Ang II) (**figure I.10**) (Taniyama and Griendling 2003). Le rôle de la myéloperoxydase (MPO) dans le contexte vasculaire a également été mis en évidence. Cette enzyme, abondante dans les phagocytes, catalyse la production de HOCl et H_2O à partir du H_2O_2 et des ions Cl^- et H^+ (**figure I.11**). La MPO utilise le NO^{\cdot} pour générer des RNS, réduisant de la sorte le NO^{\cdot} disponible.

Enfin, rappelons que la eNOS synthase peut dans certaines conditions aboutissant à l'oxydation du BH_4 (suite à l'hypertension, à un stress oxydatif,...), se découpler et produire des ions $O_2^{\cdot -}$ (voir point 1.3).

Les effets des ROS peuvent être excessivement dommageables pour les cellules. Ils peuvent modifier ou altérer plusieurs types de macromolécules comme c'est le cas pour l'ADN, les lipides et les protéines. Ce point sera détaillé au point 2.2.

Les cellules sont, bien entendu, dotées de mécanismes de détoxification contre les stress oxydants, consistant en des processus enzymatiques et non enzymatiques. Et si malgré tout, des macromolécules cellulaires sont oxydées, la cellule est équipée d'un arsenal d'enzymes

détoxifiantes capables d'inactiver le métabolisme et d'éliminer les molécules oxydées (**figure I.9**).

Les principaux processus enzymatiques de détoxification font intervenir les superoxyde dismutases (SOD), les glutathion peroxydases (GPx) et la catalase, mais il existe aussi les glutathione réductases et transférases et bien d'autres.

Parmi les processus non-enzymatiques, nous pouvons citer des substances liposolubles comme la vitamine E, le β -carotène, les flavonoïdes ou des substances hydrosolubles comme la vitamine C et le glutathion, par exemple.

Il existe également une régulation transcriptionnelle de gènes antioxydants ou détoxifiants médiée par un facteur de transcription sensible au potentiel redox, il s'agit de Nrf2 (NF-E2 Related Factor-2). Ce point sera abordé plus en détails au paragraphe 2.4.1. Néanmoins, Nrf2 n'est pas le seul facteur de transcription sensible au potentiel redox de la cellule, les voies de signalisation intracellulaire d'activation des facteurs de transcription NF- κ B (nuclear factor-kappa B) et AP-1 (activator protein-1) peuvent également être activées par les ROS (Surh, Kundu et al. 2005).

Donc, à de faibles concentrations en ROS dans la cellule, les systèmes de défense antioxydants neutralisent efficacement ces ROS. Cependant, un déséquilibre entre la production de ROS et la capacité antioxydante cellulaire conduit la cellule à un état de stress oxydant. Le stress oxydant est une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques.

2. Le peroxynitrite

Le peroxynitrite est formé principalement par une réaction de recombinaison entre le NO^\cdot et l'ion O_2^- . Il s'agit d'une molécule hautement réactionnelle pouvant réagir avec toute une série de macromolécules comme l'ADN, les lipides et les protéines. Il pourrait aussi, selon les conditions, agir en tant que messenger secondaire.

2.1. Sources de peroxynitrite

2.1.1. In situ

En conditions physiologiques, le NO^\cdot produit par les cellules endothéliales via la eNOS est rapidement consommé afin de permettre une dilatation suffisante de tous les types de vaisseaux sanguins en stimulant la guanylate cyclase soluble et en augmentant le GMPc dans les cellules musculaires lisses, comme expliqué au point 1.2. (**figure I.8**) de l'introduction. Le NO^\cdot libéré dans la lumière vasculaire empêche aussi l'agrégation et l'adhérence plaquettaires. De plus, il inhibe la synthèse d'ADN, la mitogenèse et la prolifération des cellules musculaire lisses.

Cependant, en conditions inflammatoires, la NOS inductible des cellules musculaires lisses est activée et produit de grandes quantités d'oxyde nitrique. En outre, il y a production d'anions superoxyde par la chaîne respiratoire mitochondriale, mais surtout via l'activité des NAD(P)H oxydases, xanthine oxydases et myéloperoxydases (MPO). Les anions superoxyde

sont en principe détoxifiés par dismutation catalysée par les superoxyde dismutases, mais le NO^\bullet a une plus forte affinité pour les anions superoxyde que les superoxyde dismutases. La présence simultanée d'oxyde nitrique et d'anions superoxyde génère donc du peroxynitrite (Jourdain, Jourdain et al. 2001). Etant donné que le NO^\bullet est neutre et plutôt hydrophobe, il est capable de diffuser à travers les membranes, tandis que le superoxyde est anionique à pH neutre; la formation de peroxynitrite se fera donc de manière prédominante, là où les ions $\text{O}_2^{\bullet -}$ sont produits. Signalons par ailleurs que le peroxynitrite peut traverser les membranes, soit par diffusion sous forme d'acide conjugué, l'acide peroxynitrique (ONOOH , $\text{pK}_a = 6,8$), soit sous forme anionique, via les canaux anioniques (Alvarez and Radi 2003).

2.1.2. Systèmes expérimentaux

Pour étudier les effets du peroxynitrite sur des modèles de cellules en culture, le peroxynitrite peut être utilisé en tant que tel, mais celui-ci présente l'inconvénient majeur d'être instable. Il est susceptible de se décomposer en métabolites inactifs avant même d'atteindre la cellule (Cooke and Davidge 2002). C'est pour cela que divers systèmes expérimentaux conduisant à la formation de peroxynitrite ont été décrits dans la littérature.

Nous évoquerons d'abord des donneurs d'oxyde nitrique, dont certains contribuent à produire du peroxynitrite parce qu'ils favorisent également la production d'anions superoxyde (**figure I.12**). Le glycérylnitrate (GTN) est un ester de nitrate de glycérol, qui libère du NO dans l'espace intercellulaire, comme démontré par Yamamoto *et al.* (2000) sur des cellules musculaires lisses (Yamamoto and Bing 2000). Pour être actif, le groupement nitrate du GTN doit être converti biochimiquement en NO^\bullet . Une glutathione-S-transférase et le glutathion seraient impliqués dans le métabolisme du GTN. Néanmoins, le GTN présente des effets à court terme sur les cellules.

Le nitroprusside de sodium (SNP) est un complexe d'un ion ferreux avec cinq anions cyanure et d'un ion nitrosonium (NOO^+). La production de NO^\bullet par le SNP requiert la présence de tissu vasculaire. L'interaction entre le SNP et un agent réducteur tel qu'un thiol conduit à la formation de NO^\bullet . La lumière est une condition essentielle pour la libération du NO^\bullet à partir de solutions de SNP. En effet, dans l'obscurité, le SNP ne libère pas de NO^\bullet et la libération est directement corrélée à l'intensité de la lumière, ce qui constitue un inconvénient majeur.

Le S-nitroso-N-acétylpenicillamine (SNAP) est un acide aminé N-acétylé avec un groupement fonctionnel nitrosothiol. La formation de NO^\bullet à partir de SNAP impliquerait des processus tissus indépendants et tissus dépendants. Les cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire, par exemple, présenteraient une activité catalytique importante pour la génération du NO^\bullet à partir de SNAP. Tout comme le GTN, le SNAP présente des effets relativement courts sur les cellules.

Le diéthylènetriamine/ NO (DETA/ NO) est un composé de type diéthylènetriamine portant le groupe $[\text{N}(\text{O})\text{NO}]$. Il libère du NO^\bullet sans biotransformation préalable et a un temps de demi-vie d'environ vingt heures.

Tous ces composés sont des donneurs d'oxyde nitrique mais le SNP et le SNAP produiraient également du peroxynitrite. Toutefois, notre attention s'est portée plus particulièrement sur l'hydrochlorure de 3-morpholinosydnonimine (SIN-1) qui est un composé zwitterionique formé par la combinaison d'une morpholine et d'une sydnonimine

(Yamamoto and Bing 2000). En effet, la molécule de SIN-1 subit plusieurs réarrangements électroniques jusqu'à aboutir à un équilibre entre deux structures ne différant que d'un atome, il s'agit d'une réaction de tautomérisation où un groupement fonctionnel est transformé en un autre par le déplacement simultané d'un atome d'hydrogène et d'une double liaison. Il y a ensuite libération d'oxyde nitrique et formation d'anions superoxyde, ce qui produit finalement le peroxynitrite (**figure I.13**).

Plusieurs études utilisant le SIN-1 comme source de peroxynitrite ont déjà été menées. Par exemple, Mathy-Hartert et son équipe (2000) se sont intéressés aux effets d'un antioxydant, le propofol sur des cellules endothéliales stimulées avec du SIN-1. Le propofol est un agent anesthésiant présentant des propriétés antioxydantes. L'effet cytotoxique du peroxynitrite passe par l'oxydation de groupements sulfhydryl ainsi que par des réactions d'hydroxylation et de nitrosylation. Ces auteurs ont pu démontrer les effets protecteurs de cet antioxydant sur les cellules endothéliales lorsqu'elles sont stimulées avec du SIN-1. De plus, le propofol inhiberait également la peroxydation lipidique (Mathy-Hartert, Mouithys-Mickalad et al. 2000).

Schrammel et ses collaborateurs (1998) ont montré que le SIN-1 induit l'activation de la guanylate cyclase soluble. En effet, la libération de NO⁻ et d'anions superoxyde induite par le SIN-1 médie la conversion du glutathion en S-nitrosoglutathion qui libère du NO⁻ et qui active la guanylate cyclase soluble (Schrammel, Pfeiffer et al. 1998).

Knepler et son équipe (2001) ont étudié l'effet du SIN-1 sur l'actine et la β -caténine, pour mieux comprendre les effets du peroxynitrite sur le dysfonctionnement de la barrière endothéliale. Ils ont travaillé sur des cellules endothéliales d'artères pulmonaires de porc (PAEC) sur lesquelles ils ont pu démontrer l'altération de protéines du cytosquelette après traitement des cellules avec du SIN-1 (Knepler, Taher et al. 2001).

Ayant passé en revue les différents systèmes expérimentaux pour produire le peroxynitrite, nous allons maintenant décrire les effets toxiques du peroxynitrite.

2.2. Les effets toxiques du peroxynitrite

2.2.1. Sur l'ADN

Le peroxynitrite induit diverses modifications au niveau de l'ADN. Les bases puriques peuvent subir des modifications aboutissant par exemple, à la formation de 8-nitroguanine qui résulte de la nitratisation d'une guanine par le peroxynitrite, mais aussi à la formation de 8-hydroxyguanine, de 8-oxoguanine ou encore de 5-(hydroxyméthyl)uracile (**figure I.14**) (Szabo and Ohshima 1997). Ces modifications de bases nucléiques peuvent entraîner des mutations. Par exemple, en l'absence de réparation de la 8-oxoguanine et lors de la réplication de l'ADN, une adénine sera préférentiellement incorporée en face de la base modifiée, ce qui se traduira dans la cellule par une transversion G:C vers T:A (Szabo and Ohshima 1997).

De plus, le peroxynitrite induit aussi des cassures simple brin ou double brin dans l'ADN. Il induit plus de cassures simple brin à pH acide qu'à pH neutre ou alcalin, ce qui suggère vraisemblablement que c'est l'acide peroxynitreux (ONOOH) qui est responsable de ces dommages. Ces cassures simple brin activent l'enzyme PARS (Poly (ADP-ribose) Synthetase) qui est une enzyme de réparation de l'ADN. Si le système est dépassé, il y a

accumulation des cassures simple brin qui peuvent conduire à la formation de cassures double brin. Ceci provoque alors l'arrêt du cycle cellulaire et à long terme, il peut en résulter la mort cellulaire par apoptose (Szabo and Ohshima 1997).

2.2.2. Sur les lipides

Le peroxynitrite induit la peroxydation lipidique qui est un mécanisme de dégradation en chaîne des acides gras membranaires conduisant à la formation d'hydroperoxydes instables (**figure I.15**) (Rubbo, Radi et al. 1994). Le fer n'est pas requis pour initier la peroxydation lipidique induite par le peroxynitrite.

La peroxydation lipidique se déroule en trois étapes (**figure I.15**): l'**étape d'initiation** consiste en l'arrachement d'un atome d'hydrogène et de son électron à un acide gras, ce qui conduit à la formation d'un radical d'acide gras dont le réarrangement électronique donne une diène conjuguée plus stable.

Ensuite, l'**étape de propagation** où le radical d'acide gras se combine rapidement à l'oxygène pour former un radical peroxy qui peut réagir à son tour avec un nouvel acide gras donnant ainsi un hydroperoxyde et un nouveau radical d'acide gras. Ce dernier assure la propagation en chaîne de la réaction.

Enfin, la **terminaison** résulte en la formation de composés stables issus de l'association de deux espèces radicalaires, avec fragmentation de l'acide gras aboutissant à la formation de petites molécules telles que le malondialdéhyde (MDA) ou l'hydroxynonénal (HNE).

2.2.3. Sur les protéines

Le peroxynitrite réagit directement avec certains acides aminés tels que la cystéine, le tryptophane et la méthionine. Il peut également réagir très rapidement avec les groupements prosthétiques renfermant des ions métalliques. De plus, les radicaux libres secondaires dérivés du peroxynitrite comme le radical hydroxyle, les ions carbonates et le radical de dioxyde d'azote peuvent réagir avec des acides aminés tels que la tyrosine, la phénylalanine et l'histidine (Alvarez and Radi 2003).

2.2.3.1. Réactions avec les groupements prosthétiques

La réaction du peroxynitrite avec les groupements prosthétiques renfermant des ions métalliques (particulièrement ceux contenant des ions fer, hémiques ou non, des ions cuivre et manganèse) peut conduire à la formation d'espèces oxydantes secondaires. Si ces modifications se passent près du site actif de la protéine, il en résultera alors une perte de fonction de cette protéine, telle que décrit par exemple pour la MnSOD ou la prostacycline synthase (Ischiropoulos 2003).

2.2.3.2. Réactions avec les acides aminés

Le peroxynitrite peut réagir avec les acides aminés, mais il faut bien distinguer les réactions directes et indirectes.

La cystéine est l'acide aminé qui réagit directement et le plus rapidement avec le peroxynitrite. Celui-ci réagit avec le groupement thiol d'un résidu cystéine et il en résulte la formation d'un acide sulfénique et d'ions nitrite. Cet acide sulfénique peut alors réagir avec le groupement thiol d'un autre résidu cystéine pour former cette fois, un pont disulfure entre ces deux résidus ainsi que des radicaux hydroxyl. L'oxydation des groupements thiol engendre généralement une perte de fonction de la protéine. La réaction entre le tryptophane et le peroxynitrite engendre la formation d'un radical tryptophanyl ou d'un nitrotryptophane ou encore d'un hydroxytryptophane (Alvarez and Radi 2003).

Parmi les effets indirects du peroxynitrite sur les protéines, il faut signaler principalement la nitration sur tyrosine (**figure I.16**). Cette nitration résulte d'une réaction de la tyrosine avec des radicaux hydroxyle (OH^\cdot) et dioxyde d'azote (NO_2^\cdot), ceux-ci provenant de réactions radicalaires du peroxynitrite avec le CO_2 ou des centres métalliques, le NO_2^\cdot étant donc une espèce « nitrante » secondaire (Alvarez and Radi 2003). D'autres modifications du résidu tyrosine existent, c'est le cas des 3-hydroxytyrosines, des dityrosines, des 3,5-dinitrotyrosines (Ischiropoulos 2003).

Il semble qu'il y ait une certaine spécificité au niveau des sites protéiniques subissant la nitration. Les probabilités de nitration seront plus fortes pour une tyrosine exposée, la présence d'une charge négative dans son environnement immédiat et l'absence de cystéines proximales.

La nitration des tyrosines peut inactiver les protéines, comme cela a été démontré pour la MnSOD (Peluffo and Radi 2007). Elle peut aussi perturber les cascades de transduction du signal, car une nitrotyrosine ne peut plus être phosphorylée.

Remarquons que la nitration sur tyrosine peut aussi se faire par d'autres voies. En effet, la myéloperoxydase, peroxydase des éosinophiles, la myoglobine et les cytochromes P450 catalysent l'oxydation de nitrite en dioxyde d'azote, ce dernier favorisant la formation de nitrotyrosine. De plus, la myéloperoxydase catalyse également la nitration de protéines par le peroxynitrite (Gow, Farkouh et al. 2004). Les métalloprotéines telles que la Mn superoxyde dismutase et la prostacycline dismutase pourraient catalyser leur propre nitration à partir du peroxynitrite.

Qu'il s'agisse de réactions sur les groupements prosthétiques ou avec les acides aminés (directs ou indirects), elles peuvent inactiver de nombreuses enzymes, comme synthétisé au **tableau I.1**.

Dans la littérature, beaucoup d'auteurs se sont intéressés aux dommages causés par le peroxynitrite. A titre d'exemple, Moulian et ses collaborateurs (2001) se sont intéressés aux effets du peroxynitrite, généré par le SIN-1, sur l'apoptose de thymocytes humains. Les thymocytes traités avec le SIN-1 présentent des taux élevés en 3-nitrotyrosine. Ces auteurs ont pu démontré une corrélation entre la formation de 3-nitrotyrosines et l'apoptose des thymocytes humains (Moulian, Truffault et al. 2001).

Yamaguchi et son équipe (2007) se sont intéressés aux propriétés antioxydantes de diverses molécules sur la formation de nitrotyrosines et sur l'activité de la choline acétyltransférase affectée par nitration (Yamaguchi, Nasu et al. 2007).

2.3. Mécanismes de détoxification du peroxynitrite

D'une part, l'inactivation du peroxynitrite peut se faire dans le cytosol, en réagissant avec diverses molécules. Tout d'abord, le peroxynitrite est capable de se dégrader en radicaux hydroxyl et dioxyde d'azote. Néanmoins, ce type de dégradation du peroxynitrite resterait infime. Ensuite, les antioxydants de faible poids moléculaire dont le glutathion est le plus significatif, rendent compte de l'inactivation d'une petite fraction du peroxynitrite. Les protéines contenant des ions métalliques ou du sélénium, mais aussi les protéines ne contenant pas de groupements prosthétiques sont capables de réagir avec une fraction plus élevée de peroxynitrite. Enfin, le dioxyde de carbone peut également réagir avec le peroxynitrite (Alvarez and Radi 2003).

D'autre part, il existe des systèmes antioxydants détoxifiant le peroxynitrite. Par exemple, l'ascorbate et l'acide urique peuvent réagir avec le peroxynitrite. Néanmoins, ces antioxydants de faible poids moléculaire ne sont pas très efficaces pour détoxifier le peroxynitrite. Les glutathion peroxydases peuvent réduire le peroxynitrite en nitrite aux dépens du glutathion, sans formation intermédiaire de radicaux libres. On peut également signaler les peroxyrédoxines, une famille d'enzymes antioxydantes bactérienne conservée chez les eucaryotes et qui contiennent des groupements thiols dans leurs sites actifs. Certaines peroxyrédoxines peuvent réagir avec le peroxynitrite et les produits formés sont le nitrite et l'acide sulfénique. Ce dernier, comme déjà mentionné au point 2.2.3.2, peut réagir avec un autre résidu contenant un groupement thiol afin de former un pont disulfure entre ces deux résidus et des radicaux hydroxyls. Enfin, l'hémoglobine a également été proposée comme « scavenger » intracellulaire du peroxynitrite. Ce dernier est capable de rentrer dans les globules rouges où il réagit avec l'oxyhémoglobine, très abondante. Cette réaction résulte en la formation de nitrates suite à l'isomérisation du peroxynitrite et en ferryl hémoglobine, qui sera ensuite réduit par le glutathion (Alvarez and Radi 2003). L'oxyhémoglobine peut donc être considérée comme un système intravasculaire de détoxification du peroxynitrite.

2.4. Le peroxynitrite en tant que messager secondaire

Le peroxynitrite n'a pas seulement pour effet d'altérer les macromolécules biologiques, mais il exerce aussi des effets de signalisation intracellulaire en activant les voies Nrf2 et UPR. Ces deux voies permettent à la cellule de réagir face à un stress oxydant.

2.4.1. Voie d'activation de Nrf2

Afin de se protéger des dommages cellulaires induits par les stress oxydants, les cellules possèdent des systèmes de défense antioxydants. La régulation de la transcription de plusieurs gènes encodant des enzymes de détoxification est assurée par l'élément de réponse antioxydant ARE (Antioxydant Response Element) situé dans leur promoteur. Ces gènes

protègent la cellule contre les ROS en détoxifiant ces intermédiaires de l'oxygène et en améliorant la réparation et la dégradation des protéines oxydées (Warabi, Takabe et al. 2007).

2.4.1.1. La voie de Nrf2

La famille des facteurs de transcription Nrf (Nuclear transcription Factor Erythroid 2p45-Related Factor) répond aux stress oxydants et régule l'expression des gènes dont le promoteur contient l'élément ARE. Les Nrfs font partie de la famille des facteurs de transcription CNC (Cap 'n' Collar) contenant une « tirette de leucines » basique (basic region-leucine zipper ou bZIP). Cette famille de facteur de transcription Nrf comprend NF-E2, Nrf1, Nrf2, Nrf3, Bach1 et Bach2 (**figure I.17**). NF-E2 est restreint aux érythrocytes, tandis que les protéines « NF-E2 related factor » (Nrf) sont exprimées de manière ubiquitaire (Jain, Bloom et al. 2005). Nous nous focaliserons plus particulièrement sur Nrf2, car des deux isoformes les mieux caractérisées, Nrf1 et Nrf2, c'est Nrf2 qui est significativement la plus efficace des deux pour activer l'expression génique ARE-dépendante. Quant à Nrf3, elle reste moins connue à l'heure actuelle. Par ailleurs, Sankaranarayanan et Jaiswal (2004) ont suggéré que Nrf3 serait plutôt un régulateur négatif de l'expression génique ARE-dépendante (Sankaranarayanan and Jaiswal 2004).

Nrf2 est donc le facteur de transcription qui est principalement responsable de l'expression constitutive et inductible des gènes possédant une séquence ARE au sein de leur promoteur. En conditions physiologiques normales, Nrf2 est séquestré dans le cytosol par la protéine KEAP1 (Kelch-like ECH-Associated Protein 1). Pour mieux comprendre la voie Nrf2, nous avons illustré les domaines fonctionnels de Nrf2 et de KEAP1 dans la **figure I.18**. La protéine Nrf2 (57 kDa) comporte six domaines Neh (Nrf2-ECH homology). Parmi ceux-ci le domaine Neh2 interagit avec le régulateur négatif de Nrf2, KEAP1. Ce domaine Neh2 est constitué du motif DLG (acide aspartique-leucine-glycine), de la sérine 40, de sept résidus lysine et du domaine ETGE (acide glutamique-thréonine-glycine-acide glutamique). La protéine KEAP1 comprend un domaine BTB (Broad complex-Tramtrack-Bric-a-brac), un domaine IVR (Intervening Region) et un domaine DGR (Double Glycine Repeat). KEAP1 contrôle l'ubiquitinylation de Nrf2 via l'ubiquitine ligase Cul3 (culline 3). De plus, KEAP1 possède à son extrémité N-terminale un domaine BTB où Cul3 peut se lier. KEAP1 participerait ainsi directement à la régulation de l'ubiquitinylation de Nrf2 et sa dégradation subséquente médiée par le protéasome 26S (Cullinan, Gordan et al. 2004).

Suite à un stress oxydant, Nrf2 est libéré de KEAP1 et est transloqué dans le noyau. Néanmoins, le mécanisme par lequel le stress oxydant induit la dissociation de Nrf2 de son répresseur KEAP1 reste controversé. Par contre, on sait que le stress oxydant induit aussi la dissociation des hétérodimères Bach1-Maf qui constituent un répresseur transcriptionnel des gènes régulés par Nrf2, en se liant à la séquence ARE sur l'ADN en conditions normales (Dhakshinamoorthy, Jain et al. 2005). En plus des domaines CNC et bZIP, les protéines Bach possèdent également un domaine BTB à l'extrémité N-terminale. La protéine Bach1 est ubiquitaire alors que Bach2 ne se retrouve que dans les monocytes et les cellules neuronales. Maf libéré de la protéine Bach peut alors se dimériser avec la protéine Nrf2 et activer l'expression des gènes ARE-dépendants (**figure I.19**).

Les mécanismes d'activation de Nrf2 semblent complexes. Plusieurs éléments suggèrent que la protéine kinase C (PKC) jouerait un rôle dans l'activation du facteur de transcription Nrf2. En effet, un **premier modèle** propose que la PKC phosphorylerait la sérine 40 du domaine Neh2 de Nrf2. De plus, la transcription ARE-dépendante est stimulée par

l'utilisation d'activateurs de PKC tels que le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), alors qu'elle est bloquée par l'utilisation d'inhibiteurs de PKC. De plus, la translocation nucléaire de Nrf2 est induite par le PMA, mais empêchée par les inhibiteurs de PKC. La translocation nucléaire de Nrf2 ainsi que la transcription ARE-dépendante induite par le tert-butylhydroquinone (tBHQ) sont supprimés par les inhibiteurs de PKC. Ceci suggère donc bien que la cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à la transcription ARE-dépendante passerait par la phosphorylation de Nrf2 par une PKC (**figure I.20**) (Huang, Nguyen et al. 2002).

La phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) jouerait également un rôle dans l'activation et la translocation nucléaire de Nrf2 (**figure I.20**) (Kang, Choi et al. 2002).

Les MAPKs (mitogen-activated protein kinases) telles que ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et p38 seraient également impliquées dans l'activation de l'expression génique ARE-dépendante. Cependant, le mécanisme par lequel les MAPKs induiraient cette transcription reste inconnu. D'après Numazawa et Yoshida (2004), les MAPKs n'auraient pas d'effet sur la localisation subcellulaire de Nrf2 (Numazawa and Yoshida 2004). Néanmoins, les voies ERK et JNK induisent le recrutement du co-activateur CBP/p300 (**figure I.20**) (Shen, Hebbar et al. 2004).

Un **second modèle** suggère que KEAP1 aurait un rôle de senseur du stress oxydant grâce à des résidus cystéine sensibles à l'oxydation. Lorsque la cellule est soumise à un stress oxydant, ces résidus cystéines seraient oxydés, ce qui induirait un changement conformationnel de KEAP1 entraînant la libération de Nrf2 (Kwak, Wakabayashi et al. 2004).

Ce stress oxydant entraîne également la libération du répresseur Bach1 de la petite protéine Maf. La protéine Bach1 humaine comporte 34 cystéines dont plusieurs cystéines dans le domaine de liaison à l'ADN. L'oxydation de ces cystéines entraîne le détachement de Bach1 des séquences ARE, la dissociation de la petite protéine Maf, mais aussi la translocation de Bach1 dans le cytoplasme (Ishikawa, Numazawa et al. 2005). Nrf2 peut alors se dimériser avec Maf sur la séquence ARE de l'ADN. Enfin, le co-activateur CBP/p300 se lie à l'ensemble afin d'induire l'expression des gènes cibles de Nrf2.

Les deux modèles proposés pour expliquer l'activation de Nrf2 ne sont pas exclusifs l'un de l'autre et il semble que l'activation de Nrf2 requiert, et un stress oxydant, et l'intervention de kinases.

2.4.1.2. Gènes cibles induits

Les gènes cibles induits par la voie Nrf2 sont principalement des gènes encodant des enzymes détoxifiantes (**figure I.21**). Il s'agit notamment d'enzymes de phase 1 telles que les cytochromes P450 qui modifient les xénobiotiques pour les rendre plus électrophiles. Il peut en résulter la formation de produits intermédiaires réactionnels et toxiques pour la cellule. Ces derniers sont alors détoxifiés par les enzymes de phase 2 telles que la NAD(P)H : quinone oxydoréductase 1 (NQO1), la NRH : quinone oxydoréductase 2 (NQO2), les glutathion-S-transférases,...en introduisant des groupements hydrophiles afin de faciliter leur excrétion (Jaiswal 2004; Dinkova-Kostova, Holtzclaw et al. 2005). Par exemple, la NQO1 permet la réduction complète et la détoxification de quinones hautement réactionnelles. Elle maintient également l' α -tocophérol hydroquinone et l'ubiquinol, des antioxydants endogènes

liposolubles, sous leur forme réduite. Enfin, cette oxydoréduction est requise pour la stabilisation de la protéine p53, en réponse à des stimuli entraînant des dommages à l'ADN (Nioi and Hayes 2004).

Nrf2 régule également l'expression du gène codant la hème-oxygénase 1 (HO-1). Cette enzyme catalyse la dégradation du groupement hème en biliverdine, fer et monoxyde de carbone (CO). La biliverdine est ensuite convertie en bilirubine par la bilirubine réductase. La HO-1 de par son activité, exerce des effets cytoprotecteurs bien décrits dans la littérature (Farombi and Surh 2006; Ryter, Alam et al. 2006). En bref, la biliverdine et la bilirubine sont des molécules antioxydantes, piégeant les radicaux peroxy et protégeant les cellules contre le H_2O_2 . Le CO exerce des effets anti-inflammatoires et comme le NO , active la guanylate cyclase soluble.

Nrf2 régule également des gènes codant des protéines qui jouent un rôle clé dans deux systèmes redox : le glutathion (GSH) et les thiorédoxines. Signalons par exemple, la Gclc et Gclm, sous-unités de la glutamate cystéine ligase, enzyme clé de la biosynthèse du GSH, les glutathion réductases (GSR) et les glutathion peroxydases (GPx 2 et GPx 3), ainsi que la thiorédoxine et peroxyrédoxine 1 (Prx-1) (Kensler, Wakabayashi et al. 2007). Signalons encore la SOD1 (ou SOD cytoplasmique) qui dismute les ions superoxyde en H_2O_2 et la catalase qui convertit le H_2O_2 en H_2O (**figures I.9 et I.21**).

2.4.2. Voie UPR (Unfolded Protein Response)

La réponse UPR est une voie de signalisation intracellulaire qui est activée par l'accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique (RE) suite à un stress du réticulum. Ce stress du réticulum peut être provoqué par un stress oxydant (Dickhout, Hossain et al. 2005), ou par diverses conditions interférant avec la glycosylation (déprivation en glucose ou présence d'inhibiteurs de glycosylation), ou avec le contrôle des concentrations intracellulaires en calcium (ionophore A23187 ou thapsigargine qui interfère avec les pompes à Ca^{2+}). Les agents réducteurs (dithiotréitol) et l'hypoxie sont aussi décrits comme pouvant induire un stress du RE (Yoshida 2007).

Le RE est le premier compartiment dans un réseau ordonné de membranes appelé le système endomembranaire impliqué dans la voie sécrétoire. Cette voie permet la synthèse, la modification et l'adressage de protéines biologiquement actives à leurs sites cibles dans la cellule et dans le milieu extracellulaire. Plusieurs étapes de la maturation des protéines se déroulent dans le RE. Le repliement des protéines dans ce compartiment est facilité par des protéines chaperonnes. Si le nombre de protéines mal repliées excède la capacité de repliement du RE, l'état physiologique normal du RE est perturbé. C'est le stress du RE. Dans ces conditions, la voie UPR est activée afin que le RE revienne à son état physiologique normal. La réponse UPR a donc pour but d'augmenter la capacité cellulaire d'élimination des protéines mal repliées (Cullinan and Diehl 2006). Pour cela, il y a une diminution générale de la transcription et de la traduction de la plupart des protéines et une augmentation de la dégradation des protéines mal repliées. On parlera d'ERAD pour « ER-associated protein degradation ». Enfin, afin d'augmenter la capacité de repliement des protéines, il y a une augmentation de la synthèse de protéines chaperonnes et de foldases, et le RE augmente également de taille, afin de diluer les protéines mal repliées (Bernales, Papa et al. 2006).

La chaperonne la plus abondante du RE est la protéine BiP (Binding Protein) ou Grp78 (Glucose regulated protein 78). Cette protéine chaperonne se lie aux protéines mal repliées afin de les maintenir dans cet état. BiP ne facilite pas le repliement de ces protéines, mais les

maintient dans un état qui favorise leur repliement (« folding-competent »). La protéine BiP possède à l'extrémité N-terminale un domaine ATPase et à l'extrémité C-terminale un domaine de liaison au substrat. Lorsque BiP est liée à l'ATP, BiP a une faible affinité pour son substrat. Cependant, la liaison au substrat stimule l'activité ATPase de BiP afin de générer un lien BiP-ADP qui possède une forte affinité pour le motif peptidique lié (Schroder and Kaufman 2005).

L'UPR passe par trois voies de signalisation intracellulaire aboutissant à l'activation de trois protéines transmembranaires du RE : il s'agit de PERK (Pancreatic ER Kinase), ATF6 (Activating Transcription Factor 6) et IRE1 (Inositol Requiring Enzyme 1).

En conditions physiologiques normales, les protéines PERK, ATF6 et IRE1 sont maintenues sous forme inactive par l'interaction avec la protéine BiP. Lorsque des protéines mal repliées s'accumulent dans le RE, elles sont reconnues par la protéine BiP qui se dissocie alors des protéines PERK, ATF6 et IRE. Leur libération stimule leur activation (**figure I.22**).

En effet, la protéine kinase PERK, une fois libérée de BiP, se dimérise et s'auto-phosphoryle afin d'être activée. La protéine PERK activée phosphoryle eIF2 α (eukaryotic translation Initiation Factor 2 α) empêchant ainsi l'interaction des ARNm avec la sous-unité 40S du ribosome, ce qui entraîne l'inhibition de la traduction de l'ensemble des protéines cellulaires (**figure I.23**). PERK est donc le régulateur central du contrôle traductionnel pendant la réponse UPR. Par exemple, la cycline D est une cible de l'inhibition traductionnelle dépendante de l'UPR. La cycline D permet le passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. L'arrêt de la traduction de la cycline D bloque donc le cycle cellulaire en phase G1.

Néanmoins, certaines protéines semblent échapper à cette régulation, c'est le cas du facteur de transcription ATF4 (Activating Transcription Factor 4) dont la traduction est activée en condition de stress (**figure I.22**). ATF4 favorise la transcription de gènes impliqués, à la fois dans l'import d'acides aminés, la biosynthèse du GSH et la résistance aux stress oxydatifs. ATF4 peut également favoriser l'expression du facteur transcriptionnel pro-apoptotique Gadd153 ou CHOP (C/EBP Homologous Protein). ATF4 exerce aussi un rétrocontrôle négatif sur sa propre synthèse via Gadd34, qui est une sous-unité de la protéine phosphatase 1 (PP1), qui permet la déphosphorylation de eIF2 α (Cullinan and Diehl 2006). Enfin, ATF4 peut aussi se dimériser avec Nrf2.

La voie de la protéine kinase PERK permettrait également la synthèse des constituants de l'appareil de dégradation ERAD. L'induction des gènes impliqués dans le système ERAD favorise la dégradation des protéines mal repliées du RE. Cette voie de dégradation passe par le système EDEM (ER-Degradation Enhancing Mannosidase-like protein) qui libère les protéines mal repliées de leur chaperonne. Une fois libérées, les protéines mal repliées sont transportées dans le cytoplasme pour qu'elles soient déglycosylées, puis ubiquitinylées, et enfin dégradées par le protéasome 26S (**figure I.24**) (Schroder and Kaufman 2005).

Le deuxième senseur libéré par BiP est la protéine IRE1. IRE1 possède, dans la lumière du RE, un domaine sérine/thréonine kinase à l'extrémité N-terminale et un domaine RNase à l'extrémité C-terminale cytosolique. Une fois libéré de BiP, IRE1 se dimérise et s'autophosphoryle afin d'activer son activité RNase. Son activité RNase permet le « splicing » de l'ARNm de XBP-1 (X-box Binding Protein) (**figure I.23**). La forme « splicée » de XBP-1 est un activateur transcriptionnel jouant un rôle clé dans l'induction d'une série de gènes cibles de la voie UPR, codant des enzymes impliquées dans la

dégradation des protéines mal repliées et plusieurs protéines chaperonnes résidant dans le RE telles que les protéines BiP/Grp78, Grp94 (Glucose regulated protein 94), la calréticuline (Xu, Bailly-Maitre et al. 2005). La protéine XBP-1 stimule aussi sa propre transcription. Elle permet également l'expression de l'inositol-1-phosphate synthase (INO1) responsable de la formation d'inositol-1-phosphate à partir du glucose-6-phosphate afin de synthétiser des phospholipides, qui contribueront à augmenter la taille du RE, ce qui permet de diluer les protéines mal repliées dans la lumière du RE. La voie d'activation de la protéine transmembranaire IRE1 permet également la synthèse de certains constituants de l'appareil de dégradation ERAD.

Le troisième senseur impliqué dans la réponse UPR, est la protéine ATF6. Une fois que la protéine transmembranaire ATF6 est libérée de BiP, ATF6 est d'abord transloqué dans l'appareil de Golgi. La sérine protéase S1P clive le domaine luminal d'ATF6. Une partie du domaine N-terminal ancré en membrane est clivé par la métalloprotéase S2P localisée dans la bicouche lipidique. Ces clivages protéolytiques libèrent le domaine bZIP cytosolique d'ATF6 qui est ensuite transloqué dans le noyau afin d'activer la transcription des gènes cibles (**figures I.23 et 25**). ATF6 se lie à la séquence CRE (ATF/cAMP response element) et à la séquence ERSE (ER stress response element) (Schroder and Kaufman 2005). ATF6 permet ainsi l'expression de protéines chaperonnes telles que BiP/Grp78, Grp94 et la calréticuline ainsi que des protéines catalysant le repliement comme c'est le cas pour les protéines PDI (Protein Disulfide Isomerases) (Wu and Kaufman 2006). ATF6, comme ATF4, favorise aussi la transcription du gène codant pour le facteur transcriptionnel pro-apoptotique CHOP. ATF6 permet également l'induction de XBP-1 afin de générer des niveaux en ARNm de XBP-1 plus élevés, qui constitueront les substrats pour le « splicing » médié par IRE1 (Zhang and Kaufman 2004). Enfin, la voie d'activation de la protéine transmembranaire ATF6 permet aussi la synthèse de certains constituants de l'appareil de dégradation ERAD.

L'ensemble des voies impliquées dans l'UPR est repris à la **figure I.26**. Dans la plupart des cas, le stress du réticulum endoplasmique est transitoire et les cellules restaurent son homéostasie. Cependant, un stress trop important ou de trop longue durée peut initier la mort cellulaire par apoptose, qui serait régulée par l'activité d'une caspase associée au RE (la caspase 12 chez la souris et la caspase 4 chez l'homme). En général, l'apoptose médiée par les caspases commence par une caspase initiateur qui favorise la libération du cytochrome c et de Diablo de la mitochondrie et par l'activation d'une série de caspases effectrices qui clivent d'autres protéines et l'ADN. L'association des caspases 4 et 12 au RE permettrait de percevoir directement les perturbations de celui-ci. Le clivage de la pro-caspase 4 (ou 12) serait suivi de l'activation de caspases effectrices situées en aval. Néanmoins, le mécanisme exact reste controversé (Cullinan and Diehl 2006).

CHOP (ou GADD153) est un facteur de transcription qui fait partie de la famille des protéines C/EBPs (CCAAT/enhancer binding proteins) et peut être activé à plusieurs niveaux lors du stress du RE. Les protéines C/EBPs forment une famille de facteurs de transcription qui régulent une variété de gènes impliqués dans divers processus tels que la différenciation et la prolifération. La surexpression de CHOP conduit à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose (Oyadomari and Mori 2004). Rappelons que la réponse via ATF6 et ATF4 favorise la transcription du gène codant CHOP.

En conclusion, suivant les conditions de stress, la voie UPR peut, d'une part, permettre la survie cellulaire ou d'autre part, si la cellule ne parvient pas à restaurer l'homéostasie du RE, entraîner la mort cellulaire par apoptose.

2.4.3. Interaction entre les deux voies

Récemment, on a démontré que les voies Nrf2 et UPR ne sont pas des voies complètement indépendantes, mais qu'il existe des interactions entre elles.

En effet, le facteur de transcription Nrf2 est un substrat de la protéine kinase PERK. En conditions physiologiques normales, Nrf2 est séquestré dans le cytosol par KEAP1. En cas de stress oxydant, la dissociation du complexe permet la translocation nucléaire de Nrf2 permettant ainsi l'expression de ses gènes cibles. Néanmoins, la phosphorylation dépendante de PERK est nécessaire et suffisante pour induire la dissociation du complexe Nrf2/KEAP1 et la translocation nucléaire de Nrf2 subséquente.

De plus, la translocation nucléaire de Nrf2 est indépendante de la phosphorylation de eIF2 α , eIF2 α étant le premier substrat connu de PERK (Cullinan, Zhang et al. 2003).

Enfin, comme déjà mentionné, ATF4 peut former des dimères avec Nrf2.

2.5. Détection du peroxynitrite

Etant donné l'importance des ROS et RNS dans divers processus cellulaires et patho-physiologiques, il est important de pouvoir suivre leur production à l'intérieur de la cellule. De nombreuses équipes ont donc essayé de mettre au point des méthodes de détection hautement sensibles et spécifiques. Nous développerons ici les sondes fluorescentes les plus fréquemment utilisées (Tarpey and Fridovich 2001).

Parmi les sondes fluorescentes pouvant réagir avec le peroxynitrite, nous retrouvons notamment la dihydrorhodamine 123 (DHR). Cette sonde est une molécule non fluorescente qui après oxydation est convertie en rhodamine 123, fluorescente (**figure I.27**). Le caractère lipophile de cette sonde facilite sa diffusion à travers les membranes cellulaires. L'utilisation de « scavengers » de radicaux libres et d'inhibiteurs spécifiques d'enzymes permet de faire la distinction entre l'oxydation de la sonde induite par le peroxynitrite et celle induite par d'autres espèces oxydantes.

De même, l'oxydation de la 2,7-dichlorodihydrofluorescéine (DCFH) donne un composé fluorescent, la 2,7-dichlorofluorescéine (DCF) (**figure I.28**). Cette sonde peut réagir avec divers oxydants. Cependant, Gomes et son équipe (2006) ont montré que l'utilisation de SIN-1 induit une rapide augmentation de la formation de DCF.

La réaction du peroxynitrite avec l'hydrazide de rhodamine B, un dérivé de la rhodamine non fluorescent, provoque une augmentation de la fluorescence (**figure I.29**). Comparé aux deux sondes précédentes, l'hydrazide de rhodamine B présente plusieurs avantages : sa longueur d'onde d'excitation plus élevée, son insensibilité aux variations de pH et sa haute stabilité (Gomes, Fernandes et al. 2006).

Cependant, aucune de ces sondes n'est vraiment spécifique du peroxynitrite.

Les sondes 2-[6-(4'-hydroxy)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid (HPF) et 2-[6-(4'-amino)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid (APF) sont des dérivés non fluorescents de la fluorescéine (**figure I.30**). Ces deux sondes semblent relativement spécifiques pour la détection du peroxynitrite et de radicaux OH \cdot ce qui constitue un gros avantage par rapport aux sondes précédentes. Elles sont peu réactives vis-à-vis des ions O $_2^{\cdot-}$ et

du NO. De plus, ces sondes montrent une grande résistance à l'auto-oxydation contrairement à la sonde DCFH (Gomes, Fernandes et al. 2006).

Une nouvelle sonde spécifique au peroxyxynitrite a été développée récemment, il s'agit de la sonde NiSPY-3 (**figure I.31**). Nagano et ses collaborateurs (2006) ont montré une légère augmentation de la fluorescence suite à l'addition d'autres ROS et RNS, telles que le radical hydroxyl, l'hypochlorite, l'oxygène singulet, l'oxyde nitrique, l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène, tandis qu'il y a une forte augmentation de la fluorescence suite à la réaction avec le peroxyxynitrite. La sonde NiSPY-3 conviendrait pour de l'imagerie en fluorescence sur cellules vivantes et ne serait pas cytotoxique (Ueno, Urano et al. 2006).

Le peroxyxynitrite peut également réagir avec la coelentérazine, un luminophore. L'utilisation d'inhibiteurs de l'oxyde nitrique synthase et de « scavengers » du peroxyxynitrite permet de discriminer la contribution des anions superoxyde et du peroxyxynitrite dans la production de chimiluminescence (Tarpey, Wink et al. 2004).

Outre les méthodes de détection directe du peroxyxynitrite, on peut également analyser les effets du peroxyxynitrite, par exemple sur certains acides aminés. Comme déjà mentionné dans le paragraphe 2.2.3., le peroxyxynitrite favorise la nitration et l'oxydation de composés phénoliques comme par exemple, les tyrosines. La nitration conduit à la formation de 3-nitrotyrosines tandis que l'oxydation résulte en des réactions de dimérisation et d'hydroxylation. La détection des 3-nitrotyrosines permet d'évaluer indirectement la présence de peroxyxynitrite. Les 3-nitrotyrosines sont des produits stables pouvant être directement évalués par spectrophotométrie. Néanmoins, pour une détection plus sensible et plus spécifique des 3-nitrotyrosines, l'utilisation de la HPLC (high performance liquid chromatography) ou la chromatographie en phase gazeuse est plus appropriée. Les techniques de détection électrochimique et de spectrométrie de masse sont également utilisées. Les 3-nitrotyrosines peuvent être également révélées avec un anticorps anti-nitrotyrosine couplé par exemple à la phycoérythrine (PE) ou à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). La fluorescence de ces sondes est évaluée en cytométrie de flux (Radi, Cosgrove et al. 1993). Rappelons cependant que le peroxyxynitrite n'est pas la seule cause de nitration des tyrosines.

De plus, le peroxyxynitrite se décompose en ions nitrite et nitrate pour lesquels l'électrophorèse capillaire est une technique hautement efficace pour détecter leur présence. L'avantage de l'électrophorèse capillaire sur d'autres techniques de séparation est que l'analyse peut être réalisée à pH élevé (Frankenfeld, Rosenbaugh et al. 2006).

3. Objectifs du mémoire

Le dysfonctionnement endothélial, à la base des maladies cardiovasculaires, telle que l'athérosclérose, se caractérise par une production et une disponibilité réduite de NO[•], ce qui favorise la vasoconstriction. Le peroxynitrite, produit à partir du NO[•] et des ions O₂⁻, semble jouer un rôle clé dans ce dysfonctionnement.

Des données récentes de la littérature suggèrent que le peroxynitrite est non seulement toxique, mais qu'il peut aussi dans certaines conditions jouer le rôle d'un messenger secondaire induisant une réponse de défense. Par exemple, Li et son équipe (2006) ont montré sur des cellules PC12 (cellules de phéochromocytome de rat), que le peroxynitrite activait le facteur de transcription Nrf2 et induisait l'expression de *HO-1*, enzyme antioxydante, comme nous l'avons vu dans l'Introduction (Li, Cha et al. 2006). Dickhout et ses collaborateurs (2005) quant à eux, ont montré sur des cellules endothéliales humaines en culture, que le peroxynitrite déclenchait une réponse UPR, classiquement observée suite à un stress du réticulum (Dickhout, Hossain et al. 2005).

L'objectif de ce mémoire est de vérifier sur le modèle des cellules endothéliales EAhy926, si le peroxynitrite est bien capable d'activer la voie Nrf2, et la voie UPR.

Pour produire le peroxynitrite, nous avons utilisé le SIN-1. Dans un premier temps, nous avons suivi la cytotoxicité du SIN-1, pour définir les concentrations que nous utiliserons dans ce travail. Nous avons également vérifié qu'il y avait bien production de peroxynitrite via la sonde fluorescente HPF.

Le système producteur de peroxynitrite une fois caractérisé, nous avons vérifié si le peroxynitrite active bien la voie Nrf2. Nous avons suivi l'activité de liaison à l'ADN de ce facteur de transcription (par un test colorimétrique), son activité transactivatrice (via un plasmide rapporteur), et sa translocation dans le noyau (par immuno-cytochimie en microscopie confocale). Nous avons également suivi l'expression de plusieurs gènes cibles de Nrf2 (*HO-1*, *GCLM*, *NQO1* et *GSTP1*). Des expériences préliminaires exploitant des inhibiteurs de kinases ont été menées pour décortiquer les cascades de signalisation responsables de l'activation de Nrf2.

Enfin, nous avons également vérifié que le peroxynitrite déclenchait bien une réponse UPR, et ce en suivant deux marqueurs bien décrits dans la littérature : eIF2 α phosphorylé suite à l'action de PERK et Grp94, l'une des chaperonnes majeures, induites en cas de stress du réticulum.

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons aussi voulu suivre la toxicité du peroxynitrite. Dans ce but nous avons révélé la nitratation des protéines, par un western blot avec des anticorps anti-nitrotyrosine. Il faut savoir que la nitratation des protéines fait l'objet de nombreux travaux à l'heure actuelle, puisqu'elle pourrait devenir un nouveau marqueur en pathologie cardiovasculaires (Peluffo et Radi, 2007, sous presse).

Matériels et solutions	Composition	Sources
Trypsine-EDTA stérile (acide éthylène-diamine-tétraacétique)	- Trypsine à 0,05 % - EDTA 0,53 mM	Gibco BRL, Royaume-Uni
PBS (Phosphate Buffer Saline) stérile (NaCl 150 mM)	- tampon Phosphate 10 mM - 0,9 % de NaCl pH 7,4	Biowhittaker, Belgique
Milieu D-MEM	- 4500 mg/l glucose - sans pyruvate - sans NaHCO ₃	Gibco BRL, Royaume-Uni
Milieu D-MEM + bicarbonate = DHG-L1	- 7,5 g de bicarbonate pour 5 l de milieu, pH 7,2, filtré	Merck, Germany
DHG-L1 + 10 % de sérum FBS (Fœtal Bovine Serum)		Gibco BRL, Royaume-Uni
Boîtes de culture stériles de 25cm ² (T25) et de 75cm ² (T75)		Costar, USA
Tubes stériles de 10 ml		Becton Dickinson, Royaume-Uni
Centrifugeuse		Universal Hettich, Germany
Microscope inversé		Labovet, Leitz

Tableau II.1 : Matériels et solutions utilisés pour le repiquage des cellules Eahy926

Matériels et solutions	Composition	Sources
Hank's Balanced Salt Solution: HBSS stock	Pour 500 ml: - 4 g de NaCl - 0,2 g de KCl - 30 mg de KH_2PO_4 - 0,5 g de glucose - 26,6 mg de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 175 mg de NaHCO_3 pH 7,35	Merck, Germany Merck, Germany Merck, Germany Merck, Germany Merck, Germany
Solution de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,16 M		Merck, Germany
Solution de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,24 M		Merck, Germany
CaMg HBSS	Pour 50 ml : - 50 ml de HBSS stock - 250 μl de MgSO_4 - 250 μl de CaCl_2 Solution à filtrer	Merck, Germany Merck, Germany Merck, Germany
SIN-1 (hydrochlorure de 3-morpholinosydnonimine)		Molecular Probes, USA
MTT [bromure de 3,(4,5-diméthyl-thiazol-2-yl)diphényltétrazolium]	- 50 ml de PBS (Phosphate Buffer Saline) - 125 mg de MTT	Sigma, USA
Solution de lyse	Préparer 2 volumes de SDS 30 % (dilué dans de l'eau distillée et chauffé à 37°C) et 1 volume de N,N-diméthyl-formamide pH 4,7 Solution à conserver à 37°C	Sigma, USA
Bromure d'éthidium		Sigma, USA
Acridine orange		Sigma, USA
Filtre de 0,20 μm		Sarstedt, Germany
Plaques 24 puits		Costar, USA
Lecteur de multi-plaques		Ultramark, BioRad, USA

Tableau II.2 : Matériels et solutions utilisés pour la réalisation d'un test MTT

Matériels et solutions	Composition	Sources
Solution de Bradford	Diluée 5 fois et filtrée	Colorant Bio-Rad protein Assay 5 x (Bio-Rad, USA)
Etalon BSA (Bovine Serum Albumin)	2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Pierce, USA
Spectrophotomètre		Ultrospec 2100 <i>pro</i>

Tableau II.3 : Matériels et solutions utilisés pour le dosage protéique par la méthode de Bradford

<i>Fixation des sondes de capture double brin</i>		
Matériels et solutions	Composition	Sources
Tampon Phosphate stock 0,5M	- $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0,35 M - KH_2PO_4 0,125 M pH 7,4	Merck, Germany Merck, Germany
PBS (Phosphate Buffer Saline) (NaCl 150 mM)	- tampon Phosphate 10 mM - 0,9 % de NaCl	
PBS (NaCl 50 mM)	- tampon Phosphate 10 mM - 0,3 % de NaCl	Merck, Germany
Tween 20		Sigma, USA
Trappeurs biotinylés contenant la séquence consensus du facteur de transcription Nrf2		Eurogentec, Belgique
Plaque 96 puits coatée à la streptavidine		Roche, Germany

Tableau II.4.1. : Matériels et solutions utilisés pour réaliser un test de binding (Trans-AM)

<i>Stimulation des cellules et extraction protéique</i>		
Matériels et solutions	Composition	Sources
Milieu DHG-L1 sans sérum		Gibco BRL, Royaume-Uni
SIN-1 (hydrochlorure de 3-morpholinosydnonimine)		Molecular Probes, USA
PBS (NaCl 150 mM)	- tampon Phosphate 10 mM - 0,9 % de NaCl pH 7,4	Merck, Germany
HB concentré 2 x	Pour 100 ml: - 0,95 g de Hepes (40 mM) - 0,042 g de NaF (10 mM) - 0,048 g de Na ₂ MoO ₄ (2 mM) - 0,00745 g de EDTA (0,2 mM) pH 7,9	Acros, USA Merck, Germany Sigma, USA Merck, Germany
Tampon de lyse	Pour 100 ml: - 10 ml de HB2x - 500 µl de NP-40 10 % - 89,5 ml d'H ₂ O	Sigma, USA
Solution RE	Pour 20 ml: - 10 ml HB concentré 2 x - 4 ml de glycérol 87 % - 6 ml d'H ₂ O	Merck, Germany
Solution SA	Pour 20 ml: - 10 ml de HB concentré 2 x - 4 ml de glycérol 87 % - 4 ml de NaCl 4 M (7,01 g/30 ml H ₂ O) - 2 ml d'H ₂ O	Merck, Germany Merck, Germany
PIC (Protease Inhibitor Cocktail)		Roche, Germany
PIB (Phosphatase Inhibitor Cocktail)	- Na ₃ VO ₄ 25 mM - PNPP (para-nitrophényl phosphate) 250 mM - β-glycérophosphate 250 mM - NaF 125 mM	Merck, Germany Sigma, USA Sigma, USA Merck, Germany
RE bis	500 µl RE + 20 µl PIB + 20 µl PIC	
SA bis	500 µl SA + 20 µl PIB + 20 µl PIC	
PBS + Na ₂ MoO ₄ 1 mM + NaF 5 mM	Pour 100 ml: - 24 mg Na ₂ MoO ₄ - 24 mg NaF	Sigma, USA Merck, Germany
Racloir		TPP, Switzerland
Centrifugeuse à 4°C		Eppendorf centrifuge 5415R, Germany

Tableau II.4.2. : Matériels et solutions utilisés pour réaliser un test de binding (Trans-AM)

<i>Dosage de l'activité de liaison de Nrf2 à sa séquence consensus</i>		
Matériels et solutions	Composition	Sources
PBS (NaCl 150 mM)	- tampon Phosphate 10 mM - 0,9 % de NaCl	Merck, Germany
PBS (NaCl 50 mM)	- tampon Phosphate 10 mM - 0,3 % de NaCl	Merck, Germany
Tampon de binding AP1 1x concentré	- Hepes 2 mM - EDTA 0,2 mM - NaCl 8 mM - Glycérol 12 % pH 7,5	Acros, USA Merck, Germany Merck, Germany Merck, Germany
Tampon de binding complet	- 1000 µl de tampon de binding 1x concentré - 2 µl de DTT (dithiotréitol) 1 M	Sigma, USA
Tampon de lyse	- 800 µl de tampon RE - 200 µl de tampon SA - 40 µl de PIC - 40 µl de PIB	Roche, Germany Roche, Germany
PBS 50 + Tween 20 à 0,1 %		Sigma, USA
PBS 50 + BSA à 1 %	Pour 4 ml : - 4 ml de PBS 50 - 40 mg de BSA	PAA Laboratories GmbH, Autriche
PBS 50 + Gloria	Pour 4 ml : - 4 ml de PBS 50 - 40 mg de Gloria	Nestlé, Belgique
Anticorps primaire anti-Nrf2 de lapin		Santa Cruz, USA #B0405
Anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase de Raifort (HRP)		Santa Cruz, USA #F1506
Solution chromogène (TMB)		BioSource, Belgique
Solution Stop		BioSource, Belgique
Lecteur de multi-plaques		Ultramark, BioRad, USA

Tableau II.4.3. : Matériels et solutions utilisés pour réaliser un test de binding (Trans-AM)

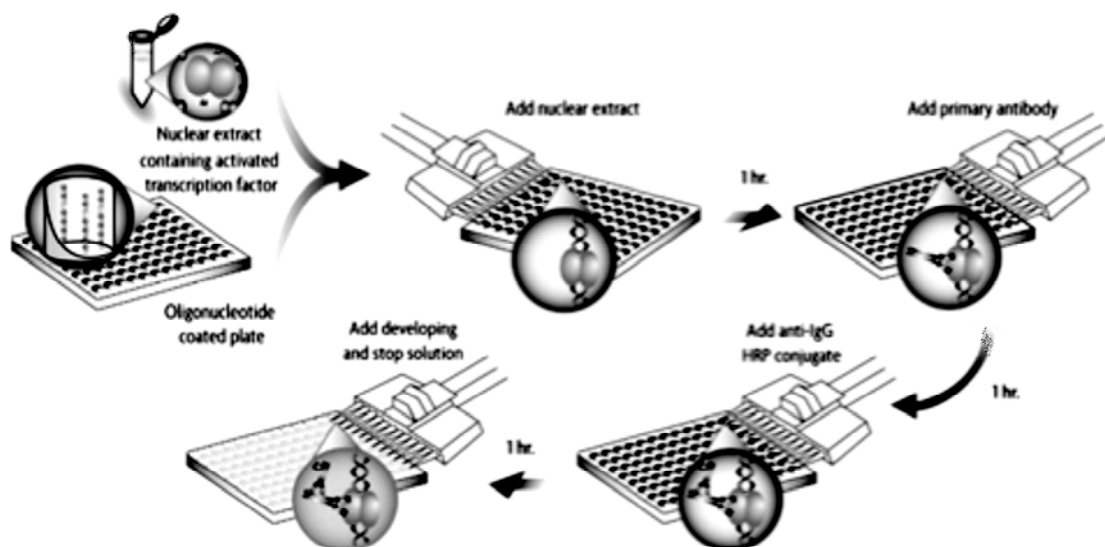


Figure II.1 : Principe du dosage Trans-AM où les extraits nucléaires contenant le facteur de transcription à détecter sont placés dans les puits d'une plaque 96 puits contenant la séquence consensus reconnue par ce facteur de transcription. Ensuite, il y a ajout des anticorps primaires dirigés contre ce facteur de transcription. Les anticorps secondaires couplés à la peroxydase HRP reconnaissent les anticorps primaires. Et enfin, suite à l'ajout d'une solution de révélation et une solution stop, la densité optique est mesurée. (www.activemotif.com)

Matériels et solutions	Composition	Sources
PBS (NaCl 150 mM)	- tampon Phosphate 10 mM - 0,9 % de NaCl pH 7,4	Merck, Germany
PBS-BSA 2 ou 3 %		PAA Laboratories GmbH, Autriche
PBS + Triton X-100 1 %		Merck, Germany
PFA (paraformaldéhyde) 4 %		Merck, Germany
Anticorps primaire polyclonal de lapin anti-Nrf2 H-300, C-20 et T-19		Santa Cruz, USA
Anticorps secondaire de souris anti-IgG de lapin couplé à une Alexa 488 nm		Molecular Probes, USA
TO-PRO 3		Molecular Probes, USA
Solution de RNase à 2 mg/ml de PBS		ICN, USA
Mowiol	Milieu de montage	Molecular Probes, USA
Plaque 24 puits		Costar, USA
Lamelles couvre-objet de 13 mm de diamètre		VWR international, Belgique
Lames porte-objet de 2,6 x 7,6 cm		VWR international, Belgique

Tableau II.5 : Matériels et solutions utilisés pour réaliser une immunofluorescence

Matériels et solutions	Composition	Sources
Tampon de lyse Biosource	- Tris pH 7,4, 10 mM - NaCl 100 mM - Glycérol 10 % - NP-40 1 % - SDS 0,1 % - DOC (déoxycholate) 0,5 % + 40 µl PIC + 40 µl PIB	Merck, Germany Merck, Germany Merck, Germany Merck, Germany Applied Biosystems, USA Merck, Germany Roche, Germany Roche, Germany
Tampon de lyse proposé par la firme « Cell Signaling »	- Tris 62,5 mM, pH 6,8 - SDS 2 % - Glycérol 10 % - DTT 50 mM	Merck, Germany Applied Biosystems, USA Merck, Germany Sigma, USA
Tampon de lyse DLA pH 8,5 DIGE-Labeling-Buffer DLA	- Urée 7 M - Thiourée 2 M - Chaps 2 % - DTT 2 %	Amersham Biosciences, UK Amersham Biosciences, UK Amersham Biosciences, UK Amersham Biosciences, UK
PBS (NaCl 150 mM)	- tampon Phosphate 10 mM - 0,9 % de NaCl pH 7,4	Merck, Germany
Racloir stérile		TPP, Switzerland

Tableau II. 6 : Matériels et solutions utilisé pour les extractions protéiques

<i>L'électrophorèse</i>		
Matériels et solutions	Composition	Sources
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, SDS 0,4 %		Merck, Germany
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, SDS 0,4 %		Merck, Germany
Gel de migration	- 2,5 ml de Tris HCl 1,5 M, pH 8,8, SDS 0,4 % - 4 ml d'Acrylamide 30 %, Bis 0,8 % - 3 ml d'H ₂ O - 10 µl de Temed - 0,5 ml de persulfate d'ammonium 1 % (APS)	Bio-Rad Laboratories, USA Plus One Pharmacia Biotech Plus One Pharmacia Biotech
Gel de concentration	- 1,25 ml de Tris HCl 0,5 M, pH 6,8, SDS 0,4 % - 0,5 ml d'Acrylamide 30 %, Bis 0,8 % - 2,75 ml d'H ₂ O - 5 µl de Temed - 0,5 ml de persulfate d'ammonium 1 % (APS)	Bio-Rad Laboratories, USA Plus One Pharmacia Biotech Plus One Pharmacia Biotech
Tampon d'électrophorèse (pH 8,3-8,4)	- Tris HCl 25 mM - Glycine 192 mM - SDS 0,1 %	Merck, Germany Merck, Germany Applied Biosystems, USA
Bleu de charge 5x	- 10 ml de Tris HCl 0,5 M, pH 6,8, SDS 0,4 % - 10 ml de SDS 20 % - 5 ml de β-mercaptoéthanol - 10 ml de glycérol - 17,5 mg de bleu de bromophénol	Applied Biosystems, USA Fluka, Germany Merck Germany Merck, Germany
Marqueur de poids moléculaire See blue Invitrogen		Invitrogen Corporation, USA
<i>Transfert des protéines sur membrane PVDF</i>		
Matériels et solutions	Composition	Sources
Méthanol		Acros, USA
Tampon de transfert (pH 8,3)	- Tris HCl 20 mM - Glycine 145 mM - Méthanol	Merck, Germany Merck, Germany Acros, USA
Membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF)		Amersham Biosciences, UK

Tableau II.7.1. : Matériels et solutions utilisés pour réaliser les western blots

<i>Traitement de la membrane et révélation</i>		
Matériels et solutions	Composition	Sources
Tampon de rinçage TBS-Tween 0,1 %	- Tris HCl 20 mM, pH 7,6 - NaCl 137 mM - Tween 20 0,1 %	Merck, Germany Merck, Germany Sigma, Germany
Agent bloquant		Amersham Biosciences, UK
Substrat de révélation		ECL (Enhanced Chemo Luminescence) Amersham Biosciences, UK
Film autoradiographique		Amersham Biosciences, UK

Tableau II.7.2. : Matériels et solutions utilisés pour réaliser les western blots

<i>Liste des anticorps primaires</i>						
Protéines d'intérêt	Poids moléculaires (kDa)	Type d'anticorps	Dilution de l'anticorps primaire	Origine	Dilution de l'anticorps secondaire	Sources
α -tubuline humaine	55	Monoclonal	1/50 000	Souris	1/200 000	Sigma, USA #T5168
Nitrotyrosine		Polyclonal	1/1 000	Lapin	1/200 000	Cell Signaling, USA #9691
GRP 94	94	Monoclonal	1/5 000	Rat	1/200 000	Stressgen, Canada #SPA-850
Nrf 2 C-20, T-19 et H-300	57	Polyclonal	1/1 000	Lapin	1/150 000	Santa Cruz, USA
<i>Liste des anticorps secondaires</i>						
IgG			Sources			
Anti-IgG de souris de mouton			Amersham Biosciences, UK			
Anti-IgG de lapin de singe			Amersham Biosciences, UK			
Anti-IgG de rat de chèvre			Amersham Biosciences, UK			
Anti-IgG de chèvre de lapin			Amersham Biosciences, UK			

Tableau II.8 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés lors des western blots

Matériels et solutions	Sources
Kit d'extraction dARNm RNAs : - RNAs Denaturing Solution - Acétate de sodium 2 M, pH 4,0 - Phénol :Chloroform :isoamyl Alcohol (99 :24 :1, pH 4,7) - Isopropanol - Eau RNase-free	Promega, USA
Ethanol 75 % RNase-free	Merck, Germany
PBS 10 mM, pH 7,4	Merck, Germany

Tableau II.9 : Matériels et solutions utilisés pour les extractions d'ARN

Matériels et solutions	Sources
RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega, USA
Ribonuclease H	Gibco BRL
Nuclease-free water	Promega, USA
Oligo dT Primer	Gibco BRL Invitrogen Corporation, USA
dNTP set	Eurogentec, Belgium
SuperScript II reverse transcriptase	Invitrogen Corporation, USA
DTT 0,1M	Invitrogen Corporation, USA
Buffer RT 5x	Invitrogen Corporation, USA

Tableau II.10 : Matériels et solutions utilisés pour réaliser la transcription inverse

Matériels et solutions	Composition	Sources
SYBR Green PCR Master Mix		Applied Biosystems, USA
Amorces sens et antisens		Applied Biosystems, USA
- GCS-1 (Glutamate Cysteine ligase catalytic Subunit)	Reverse :tgactacaagcaagacagtgtcataact Forward :gaagagagcatctggagaactaatga	
- NQO1 (NAD(P)H dehydrogenase Quinone Oxidoreductase)	Reverse :ctggagtgtgcccaatgctata Forward :aattcagagtggcattctgcattt	
- GSTP1 (Glutathione-S-Transferase)	Reverse :ctgtaccagtccaataccatcctgcgt Forward :caaagcctcctgcctatacg	
- HO-1 (Heme Oxygenase 1)	Reverse :caactcctcaaagagctggatgt Forward :gcagtcaggcagagggtgat	
- RPL13A (Ribosomal Protein L13A)	Reverse :tggctgtcactgcctgttact Forward :ctcaaggctgtgcgtctgaa	
Plaque 96 puits		Applied Biosystems, USA

Tableau II.11 : Matériels et solutions utilisés pour la Real-time RT PCR

Matériels et solutions	Composition	Sources
Hepes Buffer Solution: HBS	- Hepes 10 mM - MgCl ₂ .6H ₂ O 1 mM - CaCl ₂ 2 mM - Glucose 2,7 mM pH 7,35	Acros, USA Merck, Germany Merck, Germany Merck, Germany
Sonde HPF (hydroxyphenyl fluorescein)	5 µM	Cell Technology, USA
Plaques 24 puits		Costar, USA
Fluorimètre		Fluoroskan Ascent, Thermo, USA

Tableau II.12 : Matériels et solutions utilisés pour la détection du peroxynitrite avec la sonde HPF Fluoro Hydrxyl/Peroxynitrite

Matériels et solutions	Composition	Sources
Plasmide pARE		Don de Mr Leonard de l'université de Dublin
Plasmide pARE muté		Don de Mr Leonard de l'université de Dublin
Plasmide pRL-SV40		Promega, USA
Agent transfectant SuperFect		Qiagen, USA
Optimem		Gibco, BRL, Royaume-Uni
Optimem + 5,9 % de sérum		
PBS stérile		Biowhittaker, Belgique
Kit de révélation de la Dual-Luciférase (Dual-Luciferase Reporter Assay System)	Passive Lysis Buffer (PLB) dilué 5x dans de l'eau distillée Luciférase Assay Reagent (LAR) resuspendu dans le Luciferase Assay Buffer Stop&Glo	Promega, USA
Luminomètre		FB12 Luminometer, Berthold Detection Systems, USA

Tableau II.13 : Matériels et solutions pour la transfection des cellules et la révélation des activités luciférases

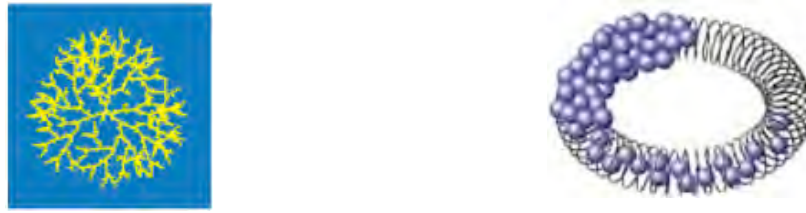


Figure II.2 : Représentation schématique du SuperFect, l'image de gauche représente le SuperFect qui est un dendrimère polycationique avec une architecture sphérique, les dendrites partent du centre pour se terminer par des groupements amines qui vont interagir avec les groupements phosphate de l'ADN. L'image de droite représente le SuperFect lié à l'ADN, il permet de le compacter et de faciliter ainsi son entrée dans la cellule. (<http://www.qiagen.com>)

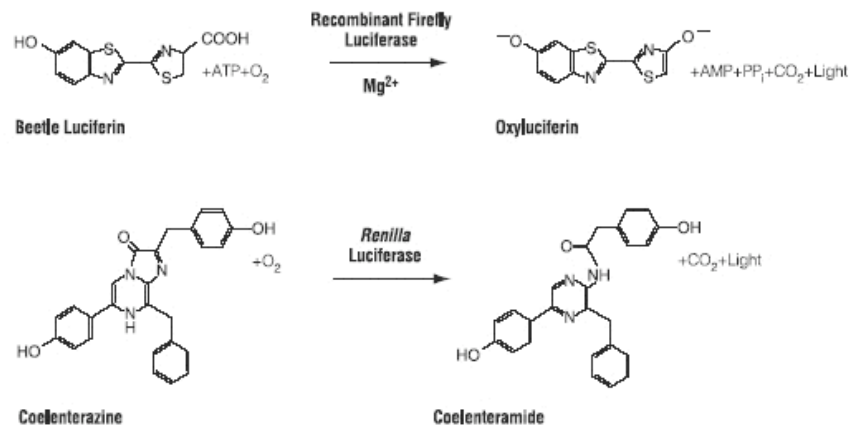


Figure II.3 : Substrats des deux luciférase utilisées dans le système Dual-luciférase

II. Matériels et méthodes

1. Culture des cellules endothéliales EAhy926

Lors de ce mémoire, nous avons utilisé la lignée cellulaire EAhy926. Il s'agit de cellules endothéliales dérivées de veine de cordon ombilical (HUVEC) fusionnées à des cellules épithéliales dérivées d'un carcinome pulmonaire. Ces cellules sont positives pour le facteur de von Willebrand, propre aux cellules endothéliales. Les cellules épithéliales dérivées d'un carcinome pulmonaire apportent le caractère immortel à la lignée EAhy926.

1.1. Repiquage des cellules EAhy926

1.1.1 Matériels et solutions

Voir **tableau II.1** pour les détails.

1.1.2 Méthode

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture stériles de 75 cm² (T75) dans du milieu DHG-L1 + 10 % de sérum de veau foetal. Ces boîtes de culture sont incubées dans une étuve à 37°C avec 5 % de CO₂ afin de maintenir un pH adéquat du milieu de culture. Les cellules sont repiquées un jour sur deux ou un jour sur trois selon le protocole suivant.

Le milieu de culture de la boîte T75 est décanté et les cellules sont rincées avec 10 ml de PBS préchauffé afin d'éliminer toute trace de sérum. Pour détacher les cellules qui adhèrent au fond de la boîte, les cellules sont incubées pendant 3 min à 37°C avec 1 ml de trypsine-EDTA. Une fois le détachement des cellules terminé, 10 ml de DHG-L1 + 10 % de sérum sont ajoutés afin de neutraliser l'action de la trypsine. La suspension cellulaire est alors transvasée dans un tube de 10 ml. Quelques µl de suspension cellulaire sont alors prélevés dans le but de réaliser un comptage des cellules. Le reste de la suspension cellulaire est centrifugé 10 minutes à 1.000 rpm, ce qui permet d'éliminer complètement la trypsine. Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 10 ml de milieu DHG-L1 + 10 % de sérum. Dans une T75, on place 5 ml de suspension cellulaire auxquels on ajoute 10 ml de milieu DHG-L1 + 10 % de sérum afin de réaliser un repiquage 1 en 2.

1.2. Test de viabilité cellulaire : test MTT

La cytotoxicité éventuelle exercée par un traitement au SIN-1 sur des cultures de cellules endothéliales EAhy926 est évaluée grâce au test MTT. Le principe de ce test est de mesurer la densité optique liée à l'accumulation du formazan, qui est un dérivé formé à partir du MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium]. Cette réaction est catalysée par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. La quantité de formazan produite est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

1.2.1. Matériels et solutions

Voir **tableau II.2** pour les détails.

1.2.2. Méthode

La veille de l'expérience, les cellules EAhy926 sont repiquées à une densité de 150 000 cellules par puits dans trois plaques 24 puits afin de stimuler les cellules pendant 3 h, 6 h et 24 h avec le SIN-1.

Le jour de la stimulation, le milieu de chaque puits est décanté et remplacé par du milieu DHG-L1 sans sérum et les cellules sont mises au repos pendant une heure à l'étuve. Ensuite, les cellules des trois plaques 24 puits sont stimulées avec du SIN-1 1 mM et 5 mM. Les plaques sont alors remises à l'étuve pour 3 h, 6 h et 24 h. Lorsque la stimulation est terminée, 500 µl de la solution de coloration MTT sont déposés dans chacun des puits. De nouveau, les plaques sont incubées pendant 2 h à l'étuve puis le milieu est décanté et 1 ml de tampon de lyse est déposé dans chaque puits. Les plaques sont incubées à 37°C sous une légère agitation pendant une heure. Et enfin, après homogénéisation, la densité optique de chaque puits est lue à 570 nm.

1.3. Test de viabilité cellulaire : test à l'acridine orange/bromure d'éthidium

La cytotoxicité éventuelle exercée par un traitement avec des inhibiteurs les cellules endothéliales EAhy926 est évaluée grâce au test acridine orange/bromure d'éthidium. L'acridine orange est une sonde fluorescente capable de s'intercaler dans les acides nucléiques des cellules vivantes. Le bromure d'éthidium s'intercale uniquement dans l'ADN des cellules mortes. Donc l'acridine orange permettra de visualiser les cellules vivantes et le bromure d'éthidium les cellules mortes.

1.3.1. Matériels et solutions

Voir **tableau II.2** pour les détails.

1.3.2. Méthode

Pour réaliser une solution d'acridine orange/bromure d'éthidium, prendre 50 mg de bromure d'éthidium et 15 mg d'acridine orange que l'on dissout dans 1 ml d'éthanol 95 %. Nous portons à volume avec 49 ml d'eau distillée. Ensuite, la solution d'acridine orange/bromure d'éthidium est diluée 100 fois dans du PBS et la solution est stockée à 4°C.

La veille de l'expérience, les cellules EAhy926 sont repiquées à une densité de 150 000 cellules par puits d'une plaque 24 puits.

Le jour de l'expérience, le milieu est décanté et les cellules sont rincées deux fois dans du PBS. Ensuite, une goutte de solution d'acridine orange/bromure d'éthidium est déposée dans chaque puits. Les cellules peuvent alors être visionnées en microscopie confocale, la longueur d'onde d'émission de l'acridine orange est de 525 nm, les cellules vivantes seront visible en vert et celle du bromure d'éthidium est de 622 nm, les cellules mortes seront donc visible en orange.

2. Dosage protéique par la méthode de Bradford

Cette méthode permet d'estimer la concentration protéique de lysats cellulaires ou nucléaires.

2.1. Matériels et solutions

Voir **tableau II.3** pour les détails.

2.2. Méthode

1 ml de solution de Bradford, diluée 5 fois et filtrée, est déposé dans des tubes dans lesquels 2 µl d'échantillon sont ajoutés. 2,5 µl de BSA (Bovine Serum Albumine 2 µg/µl) sont utilisés comme étalon, le blanc correspondant à l'étalon est de l'eau car la solution de BSA est diluée dans l'eau. En ce qui concerne le blanc des échantillons, il s'agit du tampon de lyse dans lequel les échantillons ont été dilués. Chaque mesure est réalisée en double afin d'en faire la moyenne.

La réaction colorimétrique est optimale après 5 minutes, c'est pourquoi la mesure de l'absorbance est réalisée 5 minutes après avoir ajouté l'échantillon à la solution de Bradford. La lecture de l'absorbance se fait à 595 nm grâce au spectrophotomètre. La concentration en protéines se calcule de la manière suivante (µg/µl) :

$$\frac{[(\text{moyenne échantillon} - \text{moyenne blanc})/(\text{moyenne étalon} - \text{moyenne blanc étalon})]}{\text{Volume des échantillons}} \times 5$$

3. Dosage de l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription Nrf2: test trans-AM

Le but de cette technique est de détecter la liaison d'un facteur de transcription à sa séquence consensus sur l'ADN. Des sondes de capture double brin contenant le site consensus reconnu par ce facteur de transcription sont immobilisés au fond des puits d'une plaque 96 puits. Ensuite, les extraits nucléaires de protéines sont placés dans ces puits, permettant au facteur de transcription d'intérêt de se lier spécifiquement à sa séquence consensus. La détection de cette liaison se fait par incubation d'un anticorps primaire dirigé spécifiquement contre le facteur de transcription d'intérêt et d'un anticorps secondaire anti-IgG couplé à la peroxydase HRP. En présence du substrat de cette enzyme, un résultat colorimétrique facilement quantifiable par un spectrophotomètre est obtenu (**figure II.1**).

3.1. Matériels et solutions

Voir **tableaux II.4.1, II.4.2., II.4.3** pour les détails.

3.2. Méthodes

Fixation des sondes de capture double brin

On dispose 50 µl d'une solution de trappeurs de 4 pmoles/50 µl, dilués dans du PBS, dans chaque puits. On recouvre ensuite d'un film autocollant et on incube une heure à 37°C avant de laver deux fois les puits avec 100 µl de PBS 50 + tween 20 à 0,1 %.

Un deuxième lavage est réalisé avec 200 µl d'eau distillée. Les puits seront finalement séchés à 37°C avant d'être placés en chambre froide jusqu'au dosage proprement dit (**tableau II.4.1**).

Stimulation des cellules et extraction protéique

Le milieu de culture de la boîte T25 est décanté et les cellules sont rincées avec du milieu DHG-L1 sans sérum, puis mises au repos pendant une heure avec 4 ml de DHG-L1 sans sérum. Les cellules sont ensuite incubées pendant 3 heures avec différentes concentrations de SIN-1 dilué dans du HBSS. Les contrôles ont reçu uniquement du HBSS.

Lorsque la stimulation est terminée, les T25 sont déposées sur glace et rincées avec 3 ml de PBS froid pendant 1 minute ; puis, les T25 sont décantées et les cellules sont rincées avec 3 ml de PBS- Na_2MoO_4 -NaF; de nouveau, les T25 sont décantées et les cellules sont rincées avec 3 ml de HB. Le HB permet de faire gonfler les cellules. Les T25 sont décantées deux fois et les cellules sont alors raclées dans 200 µl de tampon de lyse et le contenu de chaque T25 est récupéré dans un microtube. Les microtubes sont centrifugés 30 secondes à 13 000 rpm (Centrifuge 5415D, Eppendorf, Germany) afin de récolter les cellules. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 15 µl de RE bis, puis 23 µl de SA bis sont ajoutés. Les microtubes sont placés sur une roue pendant au moins 30 minutes à 4°C. Par la suite, une centrifugation de 10 minutes à 13 000 rpm à 4°C (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Germany) permet d'éliminer les débris. Les surnageants, contenant les protéines, sont finalement récupérés et stockés à -20°C. Ils serviront au dosage des protéines par la méthode de Bradford ainsi qu'au dosage de la liaison du facteur de transcription à sa séquence consensus (**tableau II.4.2**).

Méthode de Bradford

Voir le point 2.2. des matériels et méthodes.

Fixation des extraits protéiques

Premièrement, 30 µl de tampon de binding 1x sont déposés dans chaque puits, puis 20 µl de lysat dilué dans du tampon de lyse à une concentration de 10 µg/20 µl sont ajoutés. La plaque est alors incubée une heure à température ambiante sous une légère agitation. Ensuite, les puits sont lavés trois fois avec 200 µl de PBS 50 + Tween 20 à 0,1 % (**tableau II.4.3**).

Fixation de l'anticorps primaire

L'anticorps primaire, dilué 500 fois dans du PBS 50 + BSA 1 %, est déposé à raison de 100 µl par puits et incubé une heure à température ambiante. Afin d'éliminer les anticorps non fixés, les puits sont rincés trois fois avec 200 µl de PBS 50 + Tween 20 à 0,1 % (**tableau II.4.3**).

Fixation de l'anticorps secondaire et révélation

L'anticorps secondaire conjugué à la HRP est dilué 1 000 fois dans du PBS 50 + Gloria 1 %. 100 µl sont alors déposés dans chaque puits et la plaque est incubée une heure à température ambiante. Afin d'éliminer les anticorps non fixés, les puits sont rincés quatre fois avec 200 µl de PBS 50 + Tween 20 à 0,1 %. Afin de mettre en évidence l'activité de la HRP, 100 µl de TMB sont déposés dans chaque puits et le tout est incubé 10 minutes à l'abri de la lumière.

Enfin, 100 µl de solution stop sont ajoutés dans chaque puits pour arrêter la réaction. La liaison du facteur de transcription à sa séquence consensus est alors estimée grâce à un lecteur de multi-plaques à 450 et 655 nm (**tableau II.4.3**).

4. Immunofluorescence

Cette technique permet de visualiser et de localiser une protéine en utilisant comme moyen de détection un anticorps spécifique de la protéine cible ainsi qu'un anticorps secondaire anti-immunoglobuline couplé à un fluorochrome. La visualisation se fait en microscopie confocale grâce à l'excitation du fluorochrome à une longueur d'onde bien précise. La localisation du noyau peut s'effectuer via l'utilisation d'un agent intercalant comme le TO-PRO3.

4.1. Matériels et solutions

Voir **tableau II.5** pour les détails.

4.2. Méthode

La veille de l'expérience, les cellules sont repiquées sur des lamelles en verre dans une plaque 24 puits à raison de 150 000 cellules par puits.

Le jour de l'expérience, le milieu des cellules est décanté et les cellules sont rincées une fois avec du DHG-L1 sans sérum. Ensuite, 1 ml de DHG-L1 sans sérum est placé dans chacun des puits et les cellules sont mises au repos dans du DHG-L1 sans sérum pendant une heure à l'étuve. Lorsque la période de repos est terminée, les cellules sont stimulées avec le SIN-1 selon le protocole appliqué.

Après stimulation, le milieu de chaque puits est décanté délicatement et les lamelles sont rincées avec du PBS. Les cellules sont alors fixées pendant 10 minutes avec 500 µl de paraformaldéhyde 4 %. Après trois rinçages avec 1 ml de PBS, les cellules sont perméabilisées pendant 5 minutes avec 1 ml de PBS + Triton X-100. Toutes ces solutions sont à température ambiante. Afin de bloquer les sites non spécifiques, les cellules sont rincées trois fois pendant 10 minutes avec 1 ml de PBS-BSA. 30 µl d'anticorps primaire dilué dans du PBS-BSA sont déposés sur un parafilm placé en chambre humide excepté dans le cas du contrôle négatif pour l'anticorps primaire, où uniquement 30 µl de PBS-BSA sont déposés. Les lamelles sont alors retournées sur les gouttes placées sur les parafilms. L'incubation de l'anticorps primaire se fait toute la nuit à 4°C.

Le lendemain, les lamelles sont replacées dans la plaque 24 puits et rincées trois fois pendant 10 minutes avec 1 ml de PBS-BSA. 30 µl d'anticorps secondaire dilué dans du PBS-BSA sont déposés sur un parafilm placé en chambre humide excepté dans le cas du contrôle négatif pour l'anticorps secondaire où uniquement 30 µl de PBS-BSA sont déposés. Les lamelles sont alors retournées sur les gouttes placées sur les parafilms et l'anticorps secondaire est ajouté pour une heure à température ambiante et ceci à l'abri de la lumière afin de préserver le fluorochrome de la photodécoloration.

Lorsque la période d'incubation est terminée, les lamelles sont replacées dans la plaque 24 puits et rincées trois fois pendant 10 minutes avec 1 ml de PBS-BSA et une fois avec 1 ml de PBS seul. Afin de marquer les noyaux, le TO-PRO3 (longueur d'onde d'excitation: 640 nm) est dilué 80 fois dans une solution de RNase. 30 µl de TO-PRO3 dilué sont déposés sur les parafilms placés en chambre humide et l'incubation se fait dans l'obscurité pendant 35 minutes. Les lamelles sont ensuite rincées trois fois avec 1 ml de PBS. Enfin, le montage des lamelles se fait sur lames porte-objet à l'aide de mowiol préchauffé à 56°C. Les lames sont incubées toute la nuit à 4°C et enfin, les lamelles sont observées au microscope confocal (Leica TCS SP, Germany).

5. Extractions protéiques

L'extraction protéique permet de lyser les cellules et de libérer ainsi leur contenu. Cette extraction est réalisée grâce à un tampon de lyse. Diverses techniques d'extraction protéique ont été utilisées au cours de ce mémoire.

5.1. Matériels et solutions

Voir **tableau II.6** pour les détails.

5.2. Première méthode : Extraction avec le tampon de lyse « Biosource »

Les boîtes T25 sont déposées sur glace pour inhiber l'activité des protéases et autres enzymes de dégradation. Ensuite, les boîtes sont rincées 2 fois avec 3 ml de PBS froid. Puis, le PBS est totalement décanté et les cellules sont lysées avec 100 µl de tampon de lyse complet. Les cellules sont alors raclées, le contenu de la T25 est récupéré dans un microtube. Le tube est incubé 30 minutes sur glace et vortexé toutes les 10 minutes. Enfin, le tube est centrifugé à 13 000 rpm à 4°C (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Germany).

5.3. Deuxième méthode : Extraction avec le tampon de lyse proposé par la firme « Cell Signaling »

Les boîtes T25 sont déposées sur glace. Les boîtes sont d'abord rincées 2 fois avec 3 ml de PBS froid. Puis, le PBS est totalement décanté et les cellules sont lysées avec 250 µl de tampon de lyse. Ensuite, les cellules sont raclées et la solution est récupérée dans un microtube. La solution est alors soniquée six fois 10 secondes, dans un sonicateur de type Vibra cell (Sonics & Materials, USA).

5.4. Troisième méthode : Extraction avec le tampon de lyse DLA

Les boîtes T25 sont déposées sur glace. Les boîtes sont d'abord rincées 2 fois avec 3 ml de PBS froid. Puis, le PBS est totalement décanté et les cellules sont lysées avec 1 ml de PBS froid. Ensuite, les cellules sont raclées et la solution est récupérée dans un microtube. Le tube est centrifugé 10 minutes à 1 000 rpm (MiniSpin, Eppendorf, Germany) puis le PBS est décanté et 30 µl de tampon de lyse DLA sont ajoutés afin de resuspendre le culot. Le tube est vortexé et la solution est soniquée 20 à 30 minutes dans un sonicateur de type Branson 1510 (Branson, USA).

6. Western blot

Les extraits protéiques sont chargés dans un gel de polyacrylamide contenant du SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Le SDS est un détergent anionique qui dénature les protéines et leur confère une charge globale négative. Les protéines vont alors migrer dans le gel sous l'influence d'un courant électrique. La distance de migration d'une protéine sera donc fonction de son poids moléculaire. Une fois la migration terminée, les protéines sont transférées sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF). La protéine d'intérêt est alors détectée à l'aide d'anticorps spécifiquement dirigés contre l'un de ses épitopes (anticorps primaire). Un deuxième type d'anticorps (anticorps secondaire), couplé à la peroxydase, reconnaît le fragment Fc des anticorps primaires. La révélation est réalisée en

présence d'un substrat de la peroxydase. L'oxydation de ce substrat s'accompagne de la production de lumière qui peut être détectée grâce à un film radiographique.

6.1. Matériels et solutions

Voir **tableaux II.7.1, II.7.2** pour les détails.

6.2. Méthodes

6.2.1. L'électrophorèse

La polymérisation du gel de migration se fait pendant 45 minutes en recouvrant le gel d'une couche d'isobutanol saturé en eau afin d'optimiser la polymérisation en évitant le contact du gel avec l'oxygène. Le gel de concentration est alors coulé au-dessus du gel de migration après avoir éliminé et rincé la couche d'isobutanol. Dès que le gel de concentration est coulé, un peigne est placé dans ce gel afin de former les puits. La polymérisation dure environ 30 minutes. Le gel de concentration permet de concentrer les échantillons au fond des puits. La cuve est ensuite remplie du tampon d'électrophorèse.

Finalement, les échantillons sont traités afin d'être chargés dans les puits du gel d'électrophorèse. Pour cela, le dosage par la méthode de Bradford nous donne une estimation de la concentration en protéines de chaque échantillon, ce qui permet de calculer les volumes nécessaires pour charger chaque puits avec 40 µg de protéines. Du bleu de charge dilué 5 fois, est ajouté dans chaque échantillon. Puis les échantillons sont chauffés à 100°C pendant 4 minutes, centrifugés à 13 000 rpm pendant 30 secondes (MiniSpin, Eppendorf, Germany) et enfin, ils sont déposés dans les puits du gel de concentration. De plus, 7 µl d'un marqueur de poids moléculaire sont chargés dans un autre puit. La migration se fait à 160 mA, 200 V pendant une heure pour une cuve contenant deux mini-gels (**tableau II.7.1**).

6.2.2. Transfert des protéines sur membrane PVDF

La membrane est découpée de façon adéquate et incubée 1 minute dans du méthanol puis 15 minutes minimum dans le tampon de transfert, pour améliorer le transfert des protéines.

Ensuite, quatre morceaux de papier Whatmann sont découpés aux dimensions de la membrane. Une éponge est alors déposée dans la cuve de transfert au niveau de l'anode, deux morceaux de papier Whatmann sont déposés au-dessus puis la membrane et le gel. Celui-ci est alors recouvert de deux morceaux de papier Whatmann, eux-mêmes recouverts par une éponge. Ce système dit en sandwich doit être réalisé en évitant la formation de bulles. Le système est alors fermé et le transfert s'effectue à 150 mA, 12 V pendant deux heures (**tableau II.7.1**).

6.2.3. Traitement de la membrane et révélation

La membrane est immergée dans l'agent bloquant dilué dans du TBS-Tween 1x pendant une heure à température ambiante afin de bloquer les sites de fixation non spécifiques.

Ensuite, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire dilué de façon adéquate dans l'agent bloquant pendant toute la nuit à 4°C. Le lendemain, la membrane est lavée trois fois 10 minutes dans du TBS-Tween 1x. Ensuite, la membrane est incubée en présence de l'anticorps secondaire dilué de façon adéquate dans l'agent bloquant pendant 45 minutes à température ambiante. De nouveau, la membrane est lavée trois fois pendant 20 minutes dans du TBS-Tween 1x afin d'éliminer le surplus d'anticorps secondaire (**tableau II.8**).

Les solutions A et B des réactifs ECL (Enhancing Chemo Luminescence) sont mélangées dans un rapport 1 :1 juste avant l'utilisation. Le mélange est alors déposé sur la membrane pendant 5 minutes. Puis, la membrane est égoutée et placée entre deux feuilles de papier transparent placées préalablement dans une cassette. En chambre noire, un film radiographique est déposé sur le transparent. La durée de l'exposition du film varie en fonction de l'intensité du signal. Le film est ensuite immergé dans le révélateur jusqu'à apparition des bandes attendues puis il fait un court passage dans l'eau et enfin, il est immergé quelques minutes dans le fixateur. Les films sont finalement rincés à l'eau de ville (**tableau II.7.2**).

7. L'extraction d'ARN

L'extraction d'ARN doit absolument être réalisée dans des conditions dites « RNase Free » c'est-à-dire en absence de ribonucléases. En effet, l'ARN est très sensible à ces ribonucléases présentes sur notre peau et dans notre environnement. C'est pourquoi, nous travaillons toujours avec des gants. De plus, le plan de travail et tous les objets utilisés pour réaliser l'extraction d'ARN sont nettoyés avec du SDS 0,1%.

7.1. Matériels et solutions

Voir **tableau II.9** pour les détails.

7.2. Méthode

Au préalable, il faut veiller à placer la solution de phénol/chloroforme/isoamyl à température ambiante 15 minutes avant son utilisation et mettre la solution dénaturante sur glace.

Les cellules sont d'abord lavées avec 5 ml de PBS stérile à 4°C et après décantation totale du PBS, 200 µl de la solution dénaturante à 4°C sont déposés. Les cellules sont alors raclées et le lysat cellulaire est récupéré dans un microtube. 20 µl d'acétate de sodium 2 M sont ajoutés et les tubes sont mélangés par 4 ou 5 inversions. Puis 200 µl de la solution de phénol/chloroforme/isoamyl sont prélevés dans la phase organique et placés dans le tube. De nouveau, les tubes sont mélangés par 4 ou 5 inversions. Les microtubes sont alors agités énergiquement pendant 10 secondes jusqu'à l'obtention d'une solution blanchâtre homogène. Après une incubation sur glace pendant 15 minutes et une centrifugation à 10 000 g à 4°C (Biofuge 17RS, Heraeus, Germany) pendant 20 minutes, nous obtenons trois phases non miscibles. La phase supérieure constitue la phase aqueuse contenant l'ARN total, la phase intermédiaire constitue la galette protéique et la phase inférieure constitue la phase organique contenant les acides nucléiques et les molécules lipidiques.

La phase supérieure est récupérée délicatement sans toucher la galette protéique et transférée dans un nouvel microtube, un volume égal d'isopropanol est ajouté et le contenu est mélangé par quelques inversions. Le tube est ensuite incubé à -20°C pendant au moins 30 minutes puis centrifugé 10 minutes à 10 000 g à 4°C (Biofuge 17RS, Heraeus, Germany). Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 1 ml d'éthanol 75 % à 4°C. De nouveau, le tube est centrifugé 10 minutes à 10 000 g à 4°C (Biofuge 17RS, Heraeus, Germany). Le surnageant est éliminé et le culot mis à sécher à l'air pendant 5 à 20 minutes. Finalement, l'ARN total est resuspendu dans de l'eau sans ribonucléase.

L'ARN est ensuite dosé dans une cuvette de spectrophotomètre mesurant l'absorbance à 260 et 280 nm à partir d'une dilution 100 fois (Ultrospec 2100 *pro*).

8. La transcription inverse

La transcription inverse permet d'obtenir des brins d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'ARN messagers (ARNm). Pour cela, des amorces polyT s'hybrident aux queues polyA des ARNm et la transcriptase inverse synthétise un brin d'ADNc.

8.1. Matériels et solutions

Voir **tableau II.10** pour les détails.

8.2. Méthode

2 µg d'ARN total sont placés dans un microtube et de l'eau est ajoutée afin d'obtenir un volume final de 7,5 µl. Ensuite, 2 µl d'oligonucléotides dT à une concentration de 500 ng/ µl sont ajoutés. Le tube est alors agité énergiquement, centrifugé (Mini Centrifuge, USA) et incubé à 70°C pendant 10 minutes. Le tube est ensuite placé 5 minutes sur glace.

Lors de ces temps d'incubation, le mélange suivant est réalisé : 4 µl de Buffer RT 5x, 2 µl de DTT 0,1M, 1 µl RNasin (40U/ µl), 1 µl dNTP mix et 1 µl d'eau RNase-free.

Ensuite, 9 µl de ce mélange sont ajoutés dans l'échantillon qui est incubé pendant 5 minutes à température ambiante. Puis, 1,5 µl d'enzyme SuperScript (200U/µl) sont déposés dans le tube, suivi d'une première incubation de 1h30 à 42°C et d'une seconde incubation de 15 minutes à 70°C afin d'arrêter la réaction. 1 µl de RNaseH (2U/µl) est ajouté et l'échantillon est incubé 20 minutes à 37°C. L'ADNc obtenu est alors conservé à -20°C.

9. La PCR en temps réel

La PCR (Polymerisation Chain Reaction) en temps réel combine la réaction de PCR classique à l'utilisation d'une sonde fluorescente (SYBR Green) qui permet la quantification de l'ADN cycle par cycle. La PCR en temps réel permet donc de quantifier l'expression de gènes. Le SYBR Green est capable de s'insérer dans l'ADN double brin et il émet de la fluorescence à 520 nm. La quantité de sonde fluorescente intercalée dans l'ADN est directement proportionnelle à la quantité d'ADN.

9.1 Matériels et solutions

Voir **tableau II.11** pour les détails.

9.2. Méthode

L'ADNc obtenu est utilisé à une dilution 100 fois et les amorces à une concentration 3 µM. Pour un gène, le mélange suivant est réalisé : 2,5 µl d'eau distillée, 2,5 µl d'amorce antisens, 2,5 µl d'amorce sens et 12,5 µl de SYBR Green PCR Master Mix.

Dans une plaque 96 puits, 20 µl de ce mélange sont déposés dans chaque puits et ensuite 5 µl d'ADNc dilué 100 fois ou 5 µl d'eau distillée pour les blancs sont ajoutés. Ensuite, la plaque est recouverte d'un film autocollant puis centrifugée 5 minutes à 600 rpm (Centra CL3R, Thermo, USA). Nous utilisons le gène RPL13A comme gène de référence.

Lorsque la centrifugation est terminée, la plaque est placée dans le 7900HT Fast Real-Time PCR system ABI, c'est alors que nous encodons les paramètres ainsi que la répartition des échantillons de la plaque. Le programme des cycles de PCR peut alors commencer.

10. Détection du peroxynitrite grâce à la sonde HPF Fluoro Hydroxyl/ Peroxynitrite

La sonde HPF (hydroxyphenyl fluorescein) est une sonde spécifique pour la détection du peroxynitrite. La sonde en elle-même n'est pas fluorescente, mais lorsqu'elle est oxydée par le peroxynitrite, elle devient hautement fluorescente (Setsukinai, Urano et al. 2003).

10.1. Matériels et solutions

Voir **tableau II.12** pour les détails.

10.2. Méthode

La veille de l'expérience, les cellules sont repiquées à une densité de 500 000 cellules par puits dans une plaque 24 puits.

Le jour de l'expérience, les cellules sont rincées avec du HBS (Hepes Buffer Saline) puis la sonde HPF est chargée à raison de 500 µl par puits. Ensuite, les cellules sont incubées 30 ou 60 minutes à 37°C dans l'obscurité. Les cellules sont alors stimulées avec du SIN-1 selon le protocole appliqué. Concernant le blanc des échantillons, les cellules sont incubées uniquement avec du milieu DHG-L1 sans sérum. Enfin, la fluorescence est lue à 520 nm grâce au fluorimètre.

11. Transfection

La transfection permet d'introduire de l'ADN dans les cellules d'eucaryotes. Les systèmes rapporteurs utilisés sont des molécules de grandes tailles chargées négativement, leur entrée dans la cellule n'est donc pas un phénomène spontané. C'est pourquoi nous avons utilisé un agent transfectant, le SuperFect (**figure II.2**). Celui-ci est un dendrimère polycationique possédant une architecture sphérique. De plus, le SuperFect lie les groupements phosphate de l'ADN, ce qui permet de compacter l'ADN et de faciliter ainsi son entrée dans la cellule.

11.1. Matériels et solutions

Voir **tableau II.13** pour les détails.

11.2. Méthodes

11.2.1. Transfection et stimulation des cellules Eahy926

La veille de l'expérience, les cellules sont repiquées dans une plaque 24 puits à une densité cellulaire de 120 000 cellules par puits.

Le jour de l'expérience, les cellules sont rincées au PBS. Le mélange pour la réalisation des complexes est mis en présence des cellules et la formation des complexes se fait pendant trois heures à l'étuve. Ensuite, les cellules sont mises au repos dans du milieu sans sérum pendant une heure à l'étuve. Enfin, les cellules sont stimulées entre 20 et 24 heures avec du SIN-1 1 mM et 2,5 mM. Le lendemain, nous pouvons procéder à la révélation des activités luciférase.

11.2.2. Evaluation de la transfection grâce au système Dual-luciférase

Le système Dual-luciférase permet la quantification et la normalisation de la transfection grâce à l'utilisation de deux systèmes rapporteurs différents pouvant être révélés lors d'une même expérience.

En effet, ces deux systèmes rapporteurs comportent un gène luciférase provenant de deux organismes différents. Ces luciférases ont des structures différentes et utilisent des substrats distincts pour leur réaction en bioluminescence ce qui permet de quantifier et de normaliser les tests (**figure II.3**). Le plasmide pRL-SV40 contient l'ADNc encodant la luciférase de *Renilla reniformis*. Ce plasmide permet une expression élevée de la luciférase. De plus, il sert de contrôle pour la normalisation des expériences de transfection. Le plasmide ARE-luciférase contient le promoteur authentique de la NADPH quinone oxydoréductase (NQO1) suivi de l'ADNc encodant la luciférase de *Photinus pyralis*. Ce plasmide constitue le système rapporteur expérimental.

Enfin, le plasmide ARE-luciférase muté voit sa séquence ARE délétée et constitue donc un contrôle négatif.

D'abord, les cellules sont rincées deux fois dans 1 ml de PBS à température ambiante et lysées dans 100 µl de Passive Lysis Buffer (PLB) préalablement dilué 5x. La plaque est ensuite mise sous agitation pendant 15 minutes. Les cellules sont récupérées dans un microtube et centrifugées 3 minutes à 13 000 rpm (Centrifuge 5415D, Eppendorf, Germany) et le surnageant est récolté dans un nouvel microtube. Ensuite, 20 µl d'extrait cellulaire sont placés dans 100 µl du substrat de la Firefly luciférase (Luciferase Assay Reagent), ce qui va générer une première émission de lumière. Suite à cette première lecture, le second substrat (Stop & Glo) est ajouté, celui-ci inhibe la Firefly luciférase et initie la réaction enzymatique de la Renilla luciférase et engendre une seconde émission de lumière.

11.2.3. Normalisation des transfections avec le système Dual-luciférase

La co-transfection permet de corriger la variabilité des mesures d'activité des rapporteurs. Cette variabilité provient de différences dans l'efficacité de transfection d'un puits à l'autre.

La correction se fait en rapportant les mesures d'activité du rapporteur expérimental à un rapporteur contrôle.

La normalisation est calculée en faisant le rapport des mesures des activités respectives du rapporteur expérimental (Firefly) sur le rapporteur contrôle (Renilla).

III. Résultats et discussion

L'objectif premier de ce mémoire est l'étude du dysfonctionnement endothélial sur le modèle des cellules EAhy926 en culture, stimulées par le SIN-1, donneur de peroxy-nitrite.

Etant donné que l'exposition au peroxy-nitrite constitue un stress, notre démarche aura comme objectif tout d'abord d'investiguer dans quelle mesure la cellule endothéliale peut se défendre contre ce stress, et ce via l'activation du facteur de transcription Nrf2 et de la réponse UPR. Nous essayerons également de décortiquer par des expériences préliminaires les voies d'activation de Nrf2. D'autre part nous étudierons les effets toxiques du peroxy-nitrite en détectant, dans un premier temps, la formation de nitrotyrosines. A plus long terme ce travail s'inscrit dans le projet de thèse de Laurine Mattart qui vise à mieux cerner à partir de quand la réponse de défense au peroxy-nitrite via les voies Nrf2 et UPR ne parvenant plus à restaurer l'homéostasie cellulaire, la cellule s'engage irréversiblement vers l'apoptose.

Néanmoins, avant de commencer l'étude *in vitro* des événements induits par le peroxy-nitrite, nous allons rapidement décrire le modèle cellulaire sélectionné pour cette étude.

Modèle cellulaire utilisé

La cellule endothéliale est l'un des principaux acteurs cellulaires impliqués dans le processus de l'athérogenèse: elle est directement en contact avec tous les éléments sanguins, elle joue un rôle important dans le maintien du phénotype anti-thrombotique, anti-inflammatoire, ... Mais elle peut dans certaines conditions, s'activer et présenter un phénotype pro-thrombotique et pro-inflammatoire.

Les cellules endothéliales cultivées *in vitro*, peuvent provenir de diverses origines animales. Choisir l'origine animale d'une lignée cellulaire reste un choix délicat dû aux différentes contraintes qu'elle peut présenter : la disponibilité des cellules, leur mise en culture, leur coût, mais aussi la disponibilité des outils moléculaires et anticorps,... Le choix d'un modèle de cellules endothéliales d'origine humaine est particulièrement recommandé pour sa relevance biologique dans le contexte de pathologies humaines.

Divers types de cellules endothéliales humaines existent. Tout d'abord, les HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) sont des cellules endothéliales humaines de veine ombilicale souvent utilisées dans la littérature. Cependant, la primo-culture de ces cellules présente d'importants inconvénients: leur mise en culture n'est pas évidente et prend beaucoup de temps et elles se différencient très rapidement (Bouis, Hospers et al. 2001). De plus, il s'agit de cellules endothéliales de veines; or, les lésions athérosclérotiques touchent plus particulièrement les artères. Néanmoins, les HUVEC ont souvent fait l'objet de nombreuses études, y compris dans le contexte de l'athérosclérose (Bombeli, Schwartz et al. 1999).

Ensuite, les HAEC (Human Aortic Endothelial Cells) et HCAEC (Human Coronary Artery Endothelial Cells) sont des cellules endothéliales humaines de l'aorte et d'artères coronaires. Leur principal avantage est leur origine artérielle (Bouis, Hospers et al. 2001), mais leur culture exige des milieux extrêmement riches en facteurs de croissance, de telle sorte que plusieurs chercheurs en URBC ont pu constater que ces cellules en arrivent à être activées de manière constitutive, ce qui limite considérablement leur utilisation.

Enfin, les EAhy926 sont des cellules endothéliales humaines immortalisées. Cette lignée cellulaire résulte de la fusion entre des cellules endothéliales humaines dérivées de veines ombilicales (HUVEC) et de cellules épithéliales humaines immortelles de carcinome pulmonaire (A459). Ces cellules nous ont été gracieusement fournies par le Dr. C.J Edgell

(Professeur émérite de la South Carolina University, USA). Cette lignée de cellules hybrides montre de nombreuses caractéristiques typiques des cellules endothéliales: par exemple, on constate la présence de corps de Weibel-Palade renfermant le facteur de Von Willebrand, l'expression des VE-cadhérines au niveau des jonctions cellulaires, l'expression de la E-sélectine, de VCAM-1 et d'ICAM-1, la sécrétion du facteur de Von Willebrand, ainsi que des activités fibrinolytiques lorsqu'elles sont activées (Emeis and Edgell 1988; Bouis, Hospers et al. 2001). Par ailleurs elles ont été immortalisées et sont donc faciles à amplifier par repiquages cellulaires. C'est pourquoi nous avons choisi ce modèle cellulaire. La lignée EAhy926 constitue à l'heure actuelle le modèle le mieux caractérisé des modèles de cellules endothéliales humaines immortalisées. De plus, Bouis et son équipe ont montré que les lignées cellulaires immortelles sont généralement non seulement bien caractérisées, mais aussi plus stables que les cellules endothéliales en primo-culture qui présentent en outre une hétérogénéité selon les donneurs (Bouis, Hospers et al. 2001). La **figure III.1** montre la morphologie des cellules EAhy926 en fonction de leur confluence. A confluence (**figure III.1C**), le tapis est plutôt homogène, avec des cellules polygonales.

1. Etude de la cytotoxicité du SIN-1: test au MTT

Afin de stresser les cellules endothéliales EAhy926 pour initier un dysfonctionnement endothélial, nous les exposerons à un donneur de peroxynitrite, le SIN-1 (voir Point 2.1.2 de l'Introduction) dissous dans une solution d'HBSS. Le peroxynitrite étant une molécule hautement toxique, nous avons d'abord voulu cerner les concentrations adéquates à utiliser. C'est pourquoi, nous avons d'abord réalisé des tests de cytotoxicité sur les cellules EAhy926 à l'aide d'un test MTT. Pour cela, nous avons repiqué les cellules endothéliales la veille de l'expérience à raison de 150.000 cellules par puits d'une plaque 24 puits. Les cellules ont ensuite été mises au repos pendant une heure dans du milieu DHG-L1 sans sérum avant d'être exposées pendant 3, 6 et 24 heures avec du SIN-1 1 mM et 5 mM.

Le graphique illustré à la **figure III.2** montre le niveau relatif de viabilité exprimé en pourcentage par rapport aux cellules contrôles en fonction des conditions. Pour des temps relativement courts de 3 et 6 heures de stimulation et pour une concentration de 1 mM en SIN-1, la cytotoxicité ne dépasse pas 5 % ; avec le SIN-1 5 mM, la cytotoxicité s'élève à 16 % pour 3 heures et à 23 % pour 6 heures. Pour un temps plus long de 24 heures de stimulation et pour une concentration en SIN-1 1 mM, la cytotoxicité du SIN-1 atteint 11 %, ce qui reste acceptable. Enfin, pour 24 heures de stimulation et le SIN-1 5 mM, la cytotoxicité s'élève à 44 %. Ce résultat est représentatif de trois expériences indépendantes effectuées par deux expérimentateurs.

Nous pouvons donc en déduire que le SIN-1 1 mM s'avère très légèrement cytotoxique pour les cellules endothéliales EAhy926. Nous travaillerons donc à des concentrations de l'ordre de 1 mM pour étudier l'activation du facteur Nrf2. Mais nous envisagerons la concentration 5 mM pour détecter la présence éventuelle de nitrotyrosines (Point 6 des résultats).

Mais avant d'étudier les effets du SIN-1, nous avons voulu nous assurer qu'il y avait bien production de peroxynitrite.

2. Caractérisation de la production de peroxynitrite à partir du SIN-1 avec la sonde HPF

Après avoir testé la cytotoxicité du SIN-1, nous avons cherché à caractériser la production de peroxynitrite au cours du temps. Pour cela, nous avons utilisé la sonde HPF Fluoro Hydroxyl/ONOO⁻ décrite au Point 10 des Matériels et méthodes. Rappelons que cette sonde devient hautement fluorescente après son oxydation par le peroxynitrite et par le radical hydroxyl.

La veille de l'expérience, les cellules ont été repiquées à une densité de 500.000 cellules par puits d'une plaque 24 puits. Le jour de l'expérience, les cellules sont rincées avec du HBS puis la sonde HPF, à une concentration de 5 μ M, est rajoutée à raison de 500 μ l par puits et les cellules sont incubées 5, 10, 30, 60 et 120 minutes à 37°C dans l'obscurité. Ensuite, les cellules sont stimulées avec du SIN-1 1 mM. Enfin, la fluorescence est lue à 520 nm.

Comme le montre la **figure III.3A**, l'intensité de la fluorescence (en UA) émise par les cellules contrôles, non stimulées avec le SIN-1, reste faible et constante au cours du temps, ce qui suggère qu'il n'y a ni production constitutive de peroxynitrite, ni oxydation spontanée de la sonde. En ce qui concerne les puits où les cellules ont été stimulées avec du SIN-1 1 mM, nous observons que la fluorescence augmente au cours du temps et ce très rapidement pendant les 10 premières minutes ; ensuite bien que la fluorescence continue à augmenter pendant au moins 2 heures, la courbe semble tendre vers un plateau. Dans la **figure III.3B**, nous avons exprimé la fluorescence de manière relative, les valeurs pour les cellules contrôles étant rapportées à 1 et les résultats exprimés sous forme d'histogramme. Ceci permet de mieux visualiser l'évolution de la production du peroxynitrite. Nous observons que pour 5 minutes d'incubation des cellules avec le SIN-1, nous détectons déjà une faible production de peroxynitrite avec un signal 48 fois supérieur par rapport aux cellules contrôles. Après 10 minutes, la fluorescence relative atteint 94 fois celle des cellules contrôles. Après 30 minutes, la fluorescence relative atteint 138 fois celle des cellules contrôles. Après 60 minutes, la production du peroxynitrite s'élève à 193 fois au-dessus des cellules contrôles. Dans ce cas-ci, la production a augmenté de 4 fois par rapport à celle observée après 5 minutes, de 2 fois après 10 minutes et de 1,4 fois par rapport à celle observée après 30 minutes. Enfin, après 120 minutes, la production du peroxynitrite s'élève à 238 fois au-dessus des cellules contrôles. La production a augmenté de 5 fois par rapport à celle observée après 5 minutes, de 2,5 fois après 10 minutes, de 1,7 fois par rapport à celle observée après 30 minutes et de 1,2 fois par rapport à celle observée après 60 minutes. De nouveau, ce graphe montre l'augmentation de la production du peroxynitrite au cours du temps. Néanmoins, bien que ces résultats semblent cohérents, cette expérience, n'a été réalisée qu'une fois et il faudrait donc les confirmer.

3. Etude de l'effet du SIN-1 sur l'activation de la voie Nrf2

Afin de caractériser l'activation du facteur Nrf2 dans les cellules EAhy926 stressées en présence de SIN-1, nous avons étudié l'activité de liaison de Nrf2 à sa séquence consensus, sa translocation nucléaire par immuno-cytochimie, son activité transactivatrice après transfection des cellules avec un plasmide rapporteur (luciférase) sous le contrôle du promoteur authentique d'un gène cible de Nrf2 (*NQO1*) et nous avons également suivi l'abondance de Nrf2 par western blottings sur extraits cytosoliques ainsi que l'expression de certains gènes reconnus pour être régulés par Nrf2 par RT-PCR en temps réel.

3.1. Activité de liaison du facteur de transcription Nrf2 à sa séquence consensus

Pour tester l'effet du SIN-1 sur la voie Nrf2, nous avons commencé par réaliser un test colorimétrique en plaque multi-puits (ou test trans-AM) afin d'étudier l'activité de liaison de la protéine Nrf2 à sa séquence consensus 'ARE' sur l'ADN. Tout d'abord, nous avons réalisé une cinétique de temps afin de déterminer le pic d'activation de Nrf2. Une fois ce pic d'activation déterminé, nous avons établi une courbe de concentration en SIN-1 sur l'activation du facteur de transcription Nrf2.

3.1.1. Cinétique de temps

Au cours de cette expérience, les cellules EAhy926 ont d'abord été mises au repos une heure dans du milieu DHG-L1 sans sérum, avant d'être stimulées avec du SIN-1 1 mM pendant 30 minutes, 1, 2, 3, 4 et 5 heures. Un contrôle négatif contenant du milieu sans sérum et de l'HBSS a également été réalisé pour chaque temps. Pour le contrôle positif, les cellules ont été stimulées avec du tBHQ 50 μ M pendant 4 heures. Lors du test colorimétrique proprement dit, toutes les conditions ont été réalisées en triple.

Les résultats obtenus sont illustrés à la **figure III.4**. Les graphes représentent l'activité de liaison de Nrf2 à sa séquence consensus exprimée en pourcentage d'induction par rapport aux contrôles en fonction des conditions. La cinétique illustrée à la **figure III.4A** a été réalisée à une concentration en SIN-1 de 2,5 mM. On constate qu'il y a activation de Nrf2 déjà après 30 minutes et jusqu'à 3 heures de stimulation avec le SIN-1. Par contre, après 4 heures de stimulation, on constate une diminution de l'activité de liaison à l'ADN de Nrf2, mais qui reste néanmoins supérieure à celle mesurée pour les cellules contrôles (fixée arbitrairement à 100 %). Le contrôle positif correspondant aux cellules traitées avec le tBHQ montre également une activation comparable de Nrf2. Enfin, nous observons que l'activation de Nrf2 se maintient, entre 1 et 3 heures de stimulation, entre 240 et 310 %. La cinétique illustrée à la **figure III.4B** a été réalisée avec du SIN-1 1 mM. L'activation de Nrf2 semble démarrer un peu plus tard et est également moins intense que celle obtenue avec le SIN-1 2,5 mM. En effet, l'activation de Nrf2 reste inférieure à 300 %. Globalement, nous observons donc bien un effet activateur du SIN-1 sur Nrf2 avec un pic d'activation qui oscille entre 2 et 4 heures de stimulation.

Pour les tests colorimétriques que nous avons effectué dans la suite de ce travail, nous avons choisi un temps de stimulation en présence de SIN-1 de 3 heures.

3.1.2. Effet de la concentration en SIN-1

Après avoir réalisé les cinétiques d'activation de Nrf2 et après avoir déterminé son pic d'activation, nous avons donc étudié l'effet de la concentration en SIN-1 sur l'activation du facteur de transcription Nrf2.

Pour cela, les cellules endothéliales ont été repiquées deux jours avant l'expérience à une densité de 1.000.000 cellules par T25. Le jour de l'expérience, les cellules EAhy926 ont été mises au repos dans du milieu sans sérum avant d'être stimulées pendant 3 heures avec du SIN-1 0,5 ; 1 ; 2 et 2,5 mM. Le graphe illustré à la **figure III.5** représente le pourcentage d'induction par rapport aux contrôles en fonction des conditions. Nous observons un léger effet dose-dépendant sur l'activation du facteur de transcription Nrf2, puisqu'elle passe de \pm 200 % avec le SIN-1 0,5 mM à un peu plus de 300 % pour le SIN-1 2,5 mM. Ce test nous a

également permis de choisir la concentration à laquelle nous avons travaillé ultérieurement, c'est-à-dire à une concentration de 1 mM, puisque nous savons également qu'elle est très peu cytotoxique (**figure III.2**).

Ce résultat est représentatif de trois expériences indépendantes effectuées par deux expérimentateurs.

3.2. Détection du facteur de transcription Nrf2 par western blotting

Afin d'affiner l'étude de l'activation de Nrf2 par le SIN-1, nous avons réalisé un western blotting sur des extraits cytoplasmiques de cellules EAhy926. Pour cela, les cellules ont été repiquées deux jours avant l'extraction protéique à une densité de 1.000.000 de cellules par T25. Le jour de l'extraction, les cellules ont été mises au repos une heure dans le milieu DHG-L1 sans sérum avant d'être stimulées avec du SIN-1 1 et 2,5 mM pendant 1 et 3 heures.

Les résultats obtenus pour le western blotting sont représentés à la **figure III.6**, avec la tubuline- α utilisée comme contrôle de charge. Le contrôle positif correspond à des cellules HepG2 stimulées pendant 4 heures avec du tBHQ. Comme il s'agit d'extraits nucléaires pour les cellules traitées avec le tBHQ, la tubuline- α est absente. Le contrôle positif montre bien une activation du facteur de transcription Nrf2. Pour les cellules stimulées avec du SIN-1 1 mM, on ne voit pas d'augmentation de l'abondance protéique de Nrf2 par rapport aux cellules contrôles après 1 heure, mais il y a une légère augmentation après 2 heures. Pour la stimulation avec du SIN-1 2,5 mM, il y a une nette augmentation de l'abondance protéique de Nrf2 dans le cytoplasme dès 1 heure, mais après 3 heures, il ne semble pas y avoir d'augmentation de l'abondance de Nrf2, on voit même plutôt une diminution. Néanmoins, il faut souligner que la bande semble anormalement marquée dans la condition contrôle. Nous ne pouvons donc pas exclure une mauvaise manipulation, ce qui rend l'interprétation délicate et il faut rester prudent. Ces résultats sont cependant cohérents avec les résultats obtenus avec le test colorimétrique, puisque nous avons aussi constaté un démarrage plus lent de l'activation de Nrf2 avec le SIN-1 1 mM. Le fait d'observer une augmentation d'abondance de Nrf2 suggère que la protéine est probablement stabilisée suite à la dissociation de la protéine KEAP1. Nous avons également réalisé des extraits nucléaires pour suivre les variations d'abondance de Nrf2 dans le noyau. Pour des raisons inexplicables, l'extraction n'a pas été fructueuse, comme en témoigne l'absence de la bande correspondant à la lamine B (résultats non montrés).

Nous n'avons pas recommencé cette expérience, car elle n'était pas critique dans notre travail. Au lieu de suivre l'abondance relative de Nrf2 dans des extraits cytoplasmiques et nucléaires par western blotting, nous avons opté pour l'immuno-cytochimie en microscopie confocale, approche de choix pour révéler une translocation éventuelle de Nrf2.

3.3. Suivi de la translocation nucléaire de Nrf2 par immuno-cytochimie

L'activation de Nrf2 commence par sa translocation dans le noyau. Nous avons donc étudié la localisation subcellulaire de la protéine Nrf2 en immunofluorescence. Néanmoins, il est important de rappeler que l'approche immuno-histochimique ne permet pas une étude quantitative, mais plutôt qualitative.

Pour cela, les cellules endothéliales ont été repiquées la veille de l'expérience à une densité de 150.000 cellules par puits d'une plaque 24 puits. Le jour de l'expérience, les cellules EAhy926 ont été mises au repos une heure dans du milieu sans sérum avant d'être stimulées pendant 2, 3 et 4 heures avec du SIN-1 1 mM. Un contrôle négatif contenant du milieu sans sérum et de l'HBSS a également été réalisé pour chaque temps.

Nous avons à notre disposition trois anticorps dirigés contre la protéine Nrf2, à savoir les anticorps anti-Nrf2 H-300, C-20 et T-19 de chez Santa Cruz. Après avoir testé les trois anticorps, il s'est avéré que l'anticorps anti-Nrf2 H-300 semblait plus spécifique que les deux autres, dans notre modèle cellulaire. C'est donc cet anticorps que nous avons utilisé pour l'immunofluorescence montrée à la **figure III.7**.

La **figure III.7** révèle la distribution intracellulaire du facteur de transcription Nrf2 dans les cellules endothéliales EAhy926. Après deux heures de stimulation avec le SIN-1, on ne voit ni de différence avec les cellules contrôles ni d'augmentation de la fluorescence dans le noyau. Il n'y a donc pas encore de translocation nucléaire du facteur de transcription Nrf2. Après trois heures de stimulation par contre, on observe une nette augmentation de la fluorescence dans le noyau des cellules incubées avec le SIN-1, montrant ainsi la translocation nucléaire de Nrf2. Enfin, après quatre heures de stimulation, nous observons une diminution de la fluorescence dans le noyau des cellules stimulées. Ces résultats suggèrent que la translocation nucléaire du facteur de transcription Nrf2 est rapide et transitoire lorsque les cellules EAhy926 sont stimulées avec le SIN-1.

La **figure III.7** est représentative de deux expériences indépendantes effectuées par deux expérimentateurs.

3.4. Activité transactivatrice

L'immuno-cytochimie (**figure III.7**) montre qu'il y a bien translocation de Nrf2 dans le noyau et les tests d'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription Nrf2 nous permettent d'affirmer qu'il y a bien augmentation de la liaison du facteur de transcription à sa séquence consensus (**figures III.4 et 5**) après exposition des cellules au SIN-1, mais ces tests ne nous donnent aucun renseignement sur son activité transactivatrice. C'est pourquoi nous avons transfecté les cellules endothéliales EAhy926 avec un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase « firefly » sous le contrôle du promoteur authentique du gène encodant la NQO1, connu dans la littérature pour être régulé par Nrf2 (plasmide ARE-luciférase). Nous avons également transfecté les cellules avec le plasmide ARE muté-luciférase. Dans celui-ci, la séquence ARE n'est plus reconnue par Nrf2 (Leonard, Kieran et al. 2006).

Lors des transfections, les cellules ont été stimulées selon le protocole présenté à la **figure III.8**. Les résultats de ces transfections sont illustrés à la **figure III.9**, les graphes représentant l'activité luciférase normalisée (rapport luciférase 'Firefly'/luciférase 'Renilla') pour 2 expériences indépendantes (**figures III.9A et B**), en fonction des conditions. L'analyse des valeurs brutes montre des activités luciférase « firefly » plus élevées dans les conditions de stimulation par rapport aux contrôles en ce qui concerne la transfection avec le plasmide ARE-luciférase. Ceci permet d'obtenir une induction de l'ordre de 9 X (**figure III.9A**) et 9,5 X (**figure III.9B**) dans les cellules stimulées avec le SIN-1 par rapport aux cellules contrôles. Avec le plasmide ARE muté-luciférase, l'induction est nulle ou très faible.

Les cellules endothéliales sont récalcitrantes à la transfection (surtout à une double transfection) et nous observons donc des variations non négligeables dans les valeurs absolues des RLU. S'il est difficile de comparer ces deux expériences d'un point de vue quantitatif, il est manifeste que nous observons bien la même tendance, ce qui a été confirmé dans une 3^{ème} expérience (résultats non montrés). Ces résultats sont donc représentatifs de trois expériences indépendantes effectuées par deux expérimentateurs.

Globalement, ces résultats suggèrent que le peroxy-nitrite induit bien l'activité transactivatrice du facteur de transcription Nrf2 lorsque les cellules sont transfectées avec le plasmide ARE-luciférase sauvage. Cette activité transactivatrice chute lorsque les cellules sont transfectées avec le plasmide ARE muté-luciférase, ce qui confirme la spécificité de l'induction via la séquence ARE sauvage.

3.5. Induction de gènes cibles du facteur de transcription Nrf2

Ayant démontré par plusieurs approches complémentaires que le facteur de transcription Nrf2 est bien activé lorsque les cellules sont incubées en présence de SIN-1, nous avons voulu suivre les effets du SIN-1 sur l'expression de différents gènes décrits comme gènes cibles de Nrf2, à savoir *GSTP1*, *GCLM*, *HO-1* et *NQO1*.

Pour cela, les cellules ont été repiquées à une densité de 1.000.000 cellules par T25 deux jours avant l'expérience. Le jour de l'expérience, les cellules sont mises au repos une heure dans du DHG-L1 sans sérum avant d'être stimulées avec du SIN-1 1 mM pendant 2, 4, 6 et 8 heures lors d'une première expérience et pendant 10, 24 et 48 heures lors d'une seconde expérience.

L'abondance relative en ARNm est déterminée par RT-PCR en temps réel et les résultats obtenus illustrés à la **figure III.10A** pour les temps courts (1, 4, 6 et 8 heures) et **figure III.10B** pour les temps plus longs (10, 24 et 48 heures). Pour le gène *GSTP1*, l'abondance relative en ARNm ne semble pas changer avec le traitement au SIN-1, mis à part une très légère augmentation de 1,3 fois après deux heures. Pour la *GCLM*, l'abondance relative en ARNm semble augmenter après 6 heures de stimulation avec le SIN-1, mais pas aux temps de stimulation plus courts ou plus longs. L'abondance relative en ARNm codant la *NQO1* augmente de 1,5 fois après 4, 6, 8, 10 et 24 heures, mais chute après 48 heures. Par contre, l'abondance relative en ARNm pour la *HO-1* augmente de presque 10 fois après 2 heures de stimulation avec le SIN-1, de 6 fois après 4 et 6 heures, de 4 fois après 8 et 10 heures, de 2,5 fois après 24 heures pour retomber à des valeurs plus faibles après 48 heures.

Chaque graphe est représentatif de trois expériences indépendantes effectuées par deux expérimentateurs.

On voit donc que des 4 gènes cibles régulés par Nrf2, seul le gène *HO-1* répond de manière rapide (dès 2 heures) et avec des inductions allant jusqu'à ± 10 fois dans les cellules exposées au SIN-1 par rapport aux cellules contrôles. Cette induction s'observe encore nettement après 24 heures (4 fois).

3. 6. Effets d'inhibiteurs de kinases sur l'activation de Nrf2

Après avoir montré l'activation du facteur Nrf2 dans les cellules exposées au SIN-1, nous avons voulu dans une expérience préliminaire avoir une idée des voies de transduction du signal impliquées, et ce en testant les effets d'inhibiteurs de kinases décrites dans la

littérature pour pouvoir jouer un rôle dans l'activation de Nrf2 dans d'autres conditions de stimulation des cellules que le SIN-1. Ces inhibiteurs ont été testés sur l'activité de liaison de Nrf2 à la séquence 'ARE' par un test colorimétrique (ou test Trans-AM).

Différents modèles d'activation du facteur de transcription Nrf2 ont été décrits au point 2.4.1.1 de l'Introduction. Afin de mieux comprendre les voies de transduction du signal en amont de ce facteur de transcription suite à une stimulation avec le peroxy-nitrite, nous avons, lors d'une première expérience, testé deux inhibiteurs de la PI3K, à savoir la wortmannine et le LY294002. Lors d'une seconde expérience, nous avons testé des inhibiteurs de trois kinases: un inhibiteur de p38 (SB203580), un inhibiteur de JNK (SP600125) et un inhibiteur de la PI3K (LY294002).

Pour réaliser ces deux expériences, les cellules EAhy926 ont été repiquées à une densité de 1.000.000 de cellules par T25 deux jours avant les extractions protéiques. Le jour de ces expériences, les cellules sont mises au repos une heure dans du DHG-L1 sans sérum + inhibiteur avant d'être stimulées avec du SIN-1 1 mM pendant 3 heures.

Les résultats sont exprimés en valeurs brutes (**figure III.11.A**), c'est-à-dire la DO à 450 nm, qui reflète l'activité de liaison de Nrf2 à l'ADN. Nous avons ensuite calculé les pourcentages d'inhibition observés en présence des différents inhibiteurs. Le graphe B de la **figure III.11** montre une inhibition de 27 % par la wortmannine et une inhibition de 50 % de l'activation de Nrf2 par le LY294002 par rapport à la condition SIN-1 1 mM. Néanmoins, le contrôle wortmannine seule est fort élevé, ce qui fausse un peu les résultats, la wortmannine seule activant Nrf2. C'est pourquoi lors de la seconde expérience, nous avons uniquement utilisé le LY294002 (**figure III.C**). Seul le LY294002 semble exercer un effet inhibiteur que nous avons estimé à 62 %. Ni le SB203580, ni le SP600125 n'inhibent l'activation de Nrf2. Ces résultats suggèrent que la voie de la PI3K serait impliquée dans l'activation de Nrf2 suite à une stimulation avec le SIN-1, mais pas les voies passant par les différentes MAPK, si on se limite à l'étude de l'activité de liaison de Nrf2 à l'ADN. Mais il faut rester prudent, ces données devraient être confirmées par des expériences supplémentaires et réanalysées statistiquement, avant de tirer des conclusions définitives.

De plus, lors de la seconde expérience présentée ci-dessus, nous avons également testé la calphostine C, un inhibiteur de la protéine kinase C. Néanmoins, nous avons observé une mortalité élevée pour cet inhibiteur. C'est pourquoi, nous avons réalisé un test de cytotoxicité à l'acridine orange/bromure d'éthidium sur chacun des inhibiteurs afin d'évaluer leur toxicité sur les cellules EAhy926. L'acridine orange permet de visualiser les cellules vivantes apparaissant en vert. En effet, la longueur d'onde d'émission de l'acridine orange est de 525 nm. Le bromure d'éthidium ne peut entrer que dans les cellules mortes, visibles en orange. En effet, la longueur d'onde d'émission du bromure d'éthidium est de 622 nm. Les photos A et B (**figure III.12**) constitue le contrôle négatif où les cellules n'ont subi aucun traitement et nous n'observons aucune mortalité. Les photos C et D (**figure III.12**) constituent le contrôle SIN-1 où les cellules ont été stimulées avec du SIN-1 1 mM ; de nouveau, nous n'observons aucune mortalité. Les cellules des photos E et F (**figure III.12**) ont été stimulées avec de la calphostine C 2 μ M pendant 4 heures et l'on peut voir une mortalité cellulaire élevée. En effet, la cytotoxicité s'élève à environ 58 %. Enfin, les cellules des photos G et H (**figure III.12**) ont été mises au repos une heure avec de la calphostine C 2 μ M avant d'être stimulées avec du SIN-1 1 mM pendant 3 heures. De nouveau, la mortalité cellulaire est élevée puisqu'elle atteint environ 62 %. Ces tests de cytotoxicité ont également été réalisés sur les

inhibiteurs LY294002, SB203580, SP600125 et wortmannine, mais ils ne présentent aucune cytotoxicité (photos non montrées).

Ces résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes effectuées par 2 expérimentateurs.

3.7. Conclusion intermédiaire

L'étude des effets du SIN-1 sur la voie Nrf2 nous a tout d'abord permis de démontrer, grâce à des tests colorimétriques, l'effet activateur du peroxy-nitrite sur l'activité de liaison à l'ADN de Nrf2 et de déterminer un pic d'activation qui oscille entre 2 et 4 heures de stimulation avec le SIN-1. Ces résultats nous ont alors permis de choisir un temps de stimulation avec le SIN-1 de 3 heures afin de montrer cette fois que l'activation de Nrf2 augmente avec la concentration en SIN-1, nous permettant ainsi d'observer un léger effet dose-dépendant. Les western blottings suggèrent que le peroxy-nitrite induit une augmentation de l'abondance protéique de Nrf2, ce qui est compatible avec une stabilisation de la protéine, suite à sa dissociation de KEAP1. De plus, cette augmentation de l'abondance protéique de Nrf2 augmente avec la concentration en SIN-1. Ensuite, à l'aide d'un marquage immuno-histo-chimique, nous avons montré une nette translocation nucléaire du facteur de transcription Nrf2 après 3 heures de stimulation avec le SIN-1. Cette translocation nucléaire diminue déjà après 4 heures de stimulation. La transfection des cellules EAhy926 a montré que le peroxy-nitrite induit aussi l'activité transactivatrice de Nrf2. La technique de RT-PCR en temps réel nous a permis de suivre l'induction de gènes cibles de Nrf2. En effet, le peroxy-nitrite induit une nette augmentation de l'abondance en ARNm de l'*HO-1* dès 2 heures jusqu'à 24 heures de stimulation avec le SIN-1, une légère augmentation de l'abondance en ARNm de la *NQO1* à 4 heures et qui reste constante jusqu'à 10 heures de stimulation avec le SIN-1 et une augmentation de l'abondance en ARNm de la *GCLM* uniquement après 6 heures de stimulation avec le SIN-1. Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs de kinases suggère que le peroxy-nitrite induirait l'activation du facteur de transcription Nrf2 via la voie de la PI3K. Nous n'avons pas pu étudier la voie PKC, à cause d'un problème de toxicité de l'inhibiteur. Enfin, les MAPK ne semblent pas impliquées, du moins lorsqu'on mesure l'activité de liaison de Nrf2 à l'ADN. Il faudra prévoir de tester les différents inhibiteurs sur l'activité transactivatrice de Nrf2 et sur l'induction du gène *HO-1*. D'autres inhibiteurs devront également être testés tel que le PD98059 inhibant la voie de la MAPK p42/p44.

4. Etude de l'effet du SIN-1 sur l'activation de la voie UPR

Nous savons maintenant que les cellules incubées avec du SIN-1 se défendent contre le peroxy-nitrite en enclenchant l'activation de la voie Nrf2 qui permet entre autres d'induire des gènes antioxydants tel le gène encodant l'*HO-1*. Des données de la littérature ont suggéré que le SIN-1 pouvait également induire une réponse de type UPR sur des cellules HAEC et HUVEC (Dickhout, Hossain et al. 2005). En outre, les voies Nrf2 et UPR ne sont pas indépendantes, puisque Nrf2 est un substrat de PERK et qu'il peut se dimériser avec ATF4 (voir Point 2.4.3 de l'Introduction). Comme expliqué au point 2.4.2. de l'Introduction, il existe différents marqueurs de la voie UPR, comme par exemple, les protéines chaperonnes BiP/Grp78 et Grp94, la forme clivée d'ATF6 et les formes phosphorylées de PERK, eIF2 α et IRE1 dont l'abondance augmente significativement en cas de stress du réticulum. Afin d'étudier les effets du SIN-1 sur la voie UPR dans le modèle cellulaire utilisé dans ce travail,

nous avons réalisé un western blotting sur des extraits cytoplasmiques de cellules EAhy926. Pour cela, les cellules ont été repiquées deux jours avant l'extraction à une densité de 1.000.000 de cellules par T25. Le jour de l'extraction, les cellules ont été mises au repos une heure dans du DHG-L1 sans sérum avant d'être stimulées avec du SIN-1 1 et 2,5 mM pendant 1 heure et 3 heures.

Nous avons d'abord essayé de détecter la forme phosphorylée d'eIF2 α par western blotting (**figure III. 13**), substrat principal de la kinase PERK. Nous observons bien pour des cellules incubées une heure avec du SIN-1 1 mM, une augmentation de l'abondance protéique d'eIF2 α phosphorylé pour les cellules stimulées par rapport aux cellules contrôles. Pour la stimulation avec du SIN-1 2,5 mM, nous observons également une légère augmentation de l'abondance protéique d'eIF2 α phosphorylé dans le cytosol. En ce qui concerne la stimulation des cellules pendant trois heures avec du SIN-1 1 mM, nous n'observons plus cette augmentation de l'abondance protéique d'eIF2 α phosphorylé. Par contre, pour la stimulation avec du SIN-1 2,5 mM, il y a toujours une augmentation de l'abondance protéique d'eIF2 α phosphorylé. Ces résultats suggèrent bien une augmentation de l'abondance protéique d'eIF2 α phosphorylé lorsque les cellules sont stimulées avec le SIN-1. Il semble que l'augmentation de l'abondance protéique d'eIF2 α phosphorylé soit plus prononcée pour les cellules stimulées avec du SIN-1 1 et 2,5 mM pendant une heure qu'après 3 heures de stimulation. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation d'eIF2 α est relativement rapide puisqu'on l'observe déjà après une heure de stimulation avec le SIN-1. Par contre après 3 heures de stimulation avec le SIN-1, l'augmentation de l'abondance protéique d'eIF2 α phosphorylé est déjà moins prononcée. Ces résultats confirment bien que le peroxytnitrite active la voie UPR. Ceci suggère en outre que la phosphorylation d'eIF2 α est rapide et transitoire lorsque les cellules EAhy926 sont stimulées avec le peroxytnitrite.

Comme expliqué au point 2.4.2 de l'Introduction, la phosphorylation d'eIF2 α empêche l'interaction des ARNm avec la sous-unité 40S du ribosome, ce qui entraîne l'inhibition de la traduction de l'ensemble des protéines cellulaires. Néanmoins, un certain nombre de protéines échappent à cette régulation. C'est le cas de la protéine chaperonne Grp94 dont l'expression génique est activée par XBP-1 et ATF6 phosphorylé. Pour détecter cette protéine, il est nécessaire de stimuler les cellules EAhy926 beaucoup plus longtemps afin qu'il y ait transcription et traduction de la protéine chaperonne Grp94.

Pour cela, les cellules ont été repiquées deux jours avant l'extraction protéique à une densité de 1.000.000 de cellules par T25. Le jour de l'extraction, les cellules ont été mises au repos une heure dans du DHG-L1 sans sérum avant d'être stimulées avec du SIN-1 2,5 mM pendant 8 et 18 heures. Nous observons déjà, après 8 heures de stimulation, une augmentation de l'abondance protéique de Grp94 pour les cellules stimulées par rapport aux cellules contrôles. Après 18 heures de stimulation des cellules avec le SIN-1, nous observons une nette augmentation de l'abondance protéique de Grp94 (**figure III.14**). Ces résultats confirment bien que le peroxytnitrite active au moins un gène cible de la voie UPR. Nous savons maintenant que le peroxytnitrite induit bien un stress au niveau du réticulum endoplasmique ce qui enclenche la voie UPR qui permet notamment d'induire l'expression de la protéine chaperonne Grp94, pour faire face à ce stress.

5. Effets du SIN-1 sur la nitration des protéines

Comme nous l'avons vu au point 2.2.3. de l'Introduction, le peroxylnitrite agit non seulement comme messenger secondaire, mais peut aussi avoir des effets toxiques sur diverses macromolécules, dont la nitration de protéines. Nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à la formation des nitrotyrosines, qui révèle cette nitration. Nous avons choisi la technique du western blotting pour les détecter. Pour cela, les cellules endothéliales ont été repiquées deux jours avant l'extraction protéique totale en vue de la détection des nitrotyrosines à une densité de 1.000.000 de cellules par T25. Les cellules EAhy926 ont été stimulées pendant 4 et 6 heures avec 5 mM de SIN-1. Nous avons utilisé dans ce cas une concentration plus élevée pour augmenter les chances d'induire la nitration des protéines. Rappelons que même à 5 mM, le SIN-1 induit une cytotoxicité après 6 heures de l'ordre de 23 % (**figure III.2**).

Plusieurs mises au point ont été nécessaires pour établir correctement le protocole d'extraction des protéines et le protocole du western blotting proprement dit. Lors de notre premier essai, nous avons réalisé une extraction totale avec le tampon de lyse de type « Biosource » décrit au point 5.2. des Matériels et méthodes. De plus, lors du western blotting, nous avons dilué les anticorps primaires anti-nitrotyrosine dans une solution de 'blocking' contenant du lait « Gloria » 5 % et nous avons laissé les anticorps en présence de la membrane une heure à température ambiante. Dans ces conditions, nous n'avons pas détecté de protéines avec des nitrotyrosines.

C'est pourquoi, lors d'un second essai, nous avons choisi de garder le même type d'extraction, mais nous avons cette fois dilué les anticorps primaires dans de la BSA ou dans du lait « Amersham ». De plus, la membrane a été incubée avec les anticorps primaires anti-nitrotyrosine toute la nuit à 4°C. Malgré ces modifications du protocole, nous n'avons toujours pas détecté de protéines avec des nitrotyrosines.

Enfin, lors d'un troisième essai, nous avons changé le type d'extraction et nous avons choisi d'utiliser le tampon de lyse proposé par la firme « Cell signaling » décrit au point 5.3. des Matériels et méthodes. Cette fois, les anticorps primaires anti-nitrotyrosine ont été dilués dans du lait « Amersham » 2 % et nous les avons laissé incuber toute la nuit à 4°C. Ce protocole nous a permis de détecter des bandes correspondant à des protéines présentant des nitrotyrosines (**figure III.15**). Que ce soit après quatre heures ou six heures de stimulation, il y a augmentation de la nitration des protéines lorsque les cellules sont stimulées avec le SIN-1 par rapport aux contrôles. Cependant, étant donné que le tampon de lyse proposé par la firme « Cell Signaling » contenait déjà le bleu de bromophénol, nous n'avons pas pu réaliser de dosage protéique sur ces échantillons. Signalons également que nous obtenons de longues traînées appelées « smears ». Ceci s'explique par le fait que de nombreuses protéines portant des résidus tyrosine exposés sont susceptibles d'être modifiés suite à l'action du peroxylnitrite.

IV. Conclusions et perspectives

Depuis plusieurs années, le peroxynitrite, molécule hautement réactionnelle, fait l'objet de nombreux travaux. En effet, cette molécule produite par la présence simultanée de NO^\cdot et d'O_2^\cdot , induit un stress oxydatif qui peut être à l'origine du dysfonctionnement endothélial. En plus d'avoir des effets en tant que messager secondaire via les voies Nrf2 et UPR, le peroxynitrite peut également avoir des effets toxiques sur diverses macromolécules, dont les acides nucléiques, les protéines et les lipides.

Dans ce contexte, l'objectif de ce mémoire était d'étudier les effets du peroxynitrite sur un modèle de cellules endothéliales humaines, les cellules EAhy926, afin de mieux comprendre les différents mécanismes impliqués dans le dysfonctionnement endothélial pouvant conduire au développement de l'athérosclérose. Pour cela, nous avons réalisé une série d'expériences ayant pour but de confirmer le rôle oxydant du peroxynitrite sur les cellules endothéliales. La première partie de notre étude avait pour but de mettre en évidence, suite aux incubations en présence de SIN-1, l'induction de voies de signalisation intracellulaire. Nous avons donc voulu tester l'activation du facteur de transcription Nrf2 et suivre différents marqueurs de la voie UPR. En ce qui concerne la voie UPR, nous avons pu mettre en évidence la phosphorylation d'eIF2 α directement en aval de PERK phosphorylé et l'induction de l'expression de Grp94, protéine chaperonne, cette induction faisant intervenir, d'après la littérature, les voies passant par la phosphorylation d'IRE1 et le clivage d'ATF6 (point 2.4.2 de l'Introduction). La deuxième partie de notre étude avait pour but de mettre en évidence, suite aux incubations en présence de SIN-1, les effets toxiques du peroxynitrite. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la formation des nitrotyrosines, marqueurs de la nitratisation de protéines.

Avant de mettre en évidence les effets du peroxynitrite sur l'induction de voies de signalisation intracellulaire, il était nécessaire de tester la cytotoxicité du SIN-1 sur les cellules EAhy926 et ceci grâce à des tests de cytotoxicité au MTT ainsi que de caractériser la production du peroxynitrite à partir du SIN-1, à l'aide de la sonde HPF Fluoro Hydroxyl/ONOO $^-$ (Setsukinai, Urano et al. 2003). Les tests de cytotoxicité au MTT (**figure III.2**) ont montré que le SIN-1 a une faible toxicité sur les cellules EAhy926 à de faibles concentrations en SIN-1 (1 mM). La cytotoxicité du SIN-1 à 5 mM étant plus élevée ; néanmoins nous avons décidé de travailler principalement avec du SIN-1 à 1 et 2,5 mM. La sonde HPF Fluoro Hydroxyl/ONOO $^-$ montre clairement l'augmentation de la production de peroxynitrite au cours du temps (**figure III.3**), déjà détectée dès 5 minutes d'incubation avec le SIN-1. Les résultats obtenus avec cette sonde nous indiquent qu'il y a production de peroxynitrite et non pas de NO^\cdot , puisque cette sonde est spécifique pour le peroxynitrite. Néanmoins, la sonde HPF Fluoro Hydroxyl/ONOO $^-$ réagit également avec les radicaux hydroxyl. C'est pourquoi, afin de vérifier que le signal que nous obtenons est bien lié au peroxynitrite, il serait intéressant d'utiliser différents « scavengers ». D'une part, nous pourrions confirmer qu'il y a bien production de peroxynitrite, en utilisant des « scavengers » du NO^\cdot et d'O_2^\cdot combinés ou non. Par exemple, Saito et Kohno (2006) ont utilisé le Fe^{2+} -N-(dithiocarboxy) sarcosine (DTCS-Fe), un scavenger du NO , afin d'étudier les conditions optimales requises pour réaliser des mesures du NO par la technique de résonance de spin électronique dans un système *in vitro* contenant de la iNOS recombinante (Saito and Kohno 2006). En éliminant soit le NO^\cdot , soit les ions superoxyde, le SIN-1 ne devrait plus produire de peroxynitrite et la fluorescence de la sonde HPF devrait donc diminuer. De plus, nous pourrions également utiliser un « scavenger » du peroxynitrite. De la sorte, nous ne devrions

plus le détecter non plus. On pourrait utiliser, les métalloporphyrines telles que les Mn(III)porphyrines, qui en présence d'acide urique catalysent la décomposition du peroxyxynitrite (Trostchansky, Ferrer-Sueta et al. 2003).

Ces mises au point terminées, nous nous sommes intéressés à l'étude des effets du SIN-1 sur la voie de signalisation intracellulaire du facteur de transcription Nrf2. Nous avons pu démontrer, grâce à des tests colorimétriques, l'effet activateur du peroxyxynitrite sur l'activité de liaison à l'ADN de Nrf2 et nous avons pu déterminer un pic d'activation qui se situe entre 2 et 4 heures de stimulation avec le SIN-1. Ces résultats nous ont permis de choisir un temps de stimulation avec le SIN-1 de 3 heures afin de suivre l'activation de Nrf2 en fonction de la concentration en SIN-1 (**figure III.4**). L'étude de l'effet de la concentration sur l'activation de Nrf2 nous a permis de choisir la concentration à laquelle nous avons travaillé par la suite (1 mM). La technique du western blotting a montré que le peroxyxynitrite induit l'augmentation de l'abondance protéique de Nrf2 au niveau cytosolique. Ceci suggère que la protéine est probablement stabilisée suite à la dissociation de la protéine KEAP1. De plus, l'approche immuno-histochimique montre une nette translocation nucléaire de Nrf2 après 3 heures de stimulation avec le SIN-1 (**figure III.7**), ce qui confirme en partie les résultats obtenus grâce aux tests colorimétriques, cette translocation étant rapide et transitoire. Nos résultats originaux sur les cellules endothéliales EAhy926 sont conformes avec les données de la littérature sur d'autres modèles de cellules endothéliales ou d'autres types cellulaires. En effet, Cao et son équipe (2005) ont montré, grâce à la technique du western blotting, l'activation de la voie Nrf2 sur des cellules SH-SY5Y, cellules de neuroblastome humain, suite à l'utilisation de SIN-1 (Cao, Ma et al. 2005). Kang et son équipe (2002) ont également montré que le peroxyxynitrite dérivé du SIN-1, induit la translocation nucléaire de Nrf2 dans les cellules H4IIE (cellules d'hépatome de rat). De plus, la technique du retard sur gel leur a permis de détecter la dimérisation Nrf2-Maf sur le même type cellulaire (Kang, Choi et al. 2002). Enfin, Hosoya et son équipe (2005) ont utilisé des siRNA dirigés contre Nrf2 et ont pu ainsi démontrer, dans un modèle de cellules HAEC (human aortic endothelial cells), que Nrf2 est indispensable pour l'expression des gènes régulés par ARE (Hosoya, Maruyama et al. 2005).

Nous avons également montré que le peroxyxynitrite induit l'activité transactivatrice de Nrf2 suite à la transfection des cellules EAhy926 avec le plasmide ARE-luciférase (**figure III.9**). Rappelons que ce plasmide rapporteur contient le promoteur authentique de la *NQO1* suivi du gène codant pour la luciférase « firefly ». L'analyse du promoteur de la *NQO1* réalisée sur le site « Biobase » (<http://www.biobase-international.com/pages/>) a montré qu'il n'y a qu'un seul site 'ARE' pour le facteur de transcription Nrf2. Par contre, les cellules transfectées avec le plasmide ARE muté-luciférase dont la séquence ARE est déléetée, voient l'activité luciférase fortement réduite, mais pas complètement abolie, contrairement à ce que Leonard et son équipe (2006) ont observé sur des cellules HK-2 (cellules épithéliales de prostate) transfectées avec ces mêmes plasmides. Ces auteurs ont étudié les effets de la réoxygénation après hypoxie (ischémie/reperfusion) (Leonard, Kieran et al. 2006) et montrent que Nrf2 est activé dans divers modèles d'ischémie/reperfusion. Néanmoins, le promoteur de la *NQO1* possède également 11 sites putatifs pour le facteur de transcription AP-1 et 2 sites pour NF-κB. Etant donné que les facteurs de transcription AP-1 et NF-κB sont également sensibles aux stress oxydants (Surh, Kundu et al. 2005), nous ne pouvons pas exclure qu'ils aient aussi été activés suite à la stimulation des cellules au SIN-1, ce qui expliquerait le faible taux d'induction observé lors de la transfection des cellules EAhy926 avec le plasmide ARE muté-luciférase. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions vérifier les effets du SIN-1 sur l'activité de liaison à l'ADN et du facteur AP-1 et du facteur NF-κB, via les tests

colorimétriques disponibles au laboratoire. Nos résultats suggèrent néanmoins que Nrf2 est le principal facteur de transcription activé lors d'un stress oxydant induit par le peroxy-nitrite.

Nous avons ensuite suivi l'expression de plusieurs gènes décrits dans la littérature, comme étant des gènes cibles de Nrf2. Cette analyse par RT-PCR en temps réel nous a montré que le peroxy-nitrite induit une nette augmentation de l'abondance relative des ARNm codant la HO-1, une faible augmentation de l'abondance relative des ARNm codant la NQO1, mais qui reste constante au cours du temps, une très faible augmentation de l'abondance relative des ARNm codant la GCLM mais uniquement après 6 heures de stimulation avec le SIN-1, et nous n'observons pas d'augmentation de l'abondance relative des ARNm codant la GSTP1. Nous pouvons en conclure que le peroxy-nitrite induit certainement la transcription du gène codant l'hème oxygénase 1 (HO-1) et une transcription moins prononcée de la NAD(P)H :quinone oxydoréductase 1 (NQO1) et de l'unité régulatrice de la glutamylcystéine synthétase (GCLM). Les résultats obtenus en RT-PCR en temps réel en ce qui concerne NQO1 ne corroborent donc pas tout-à-fait les résultats obtenus en transfection. Le plasmide rapporteur est contrôlé par un fragment de 1.1 Kb de la région promotrice du gène *NQO1*. Il se peut qu'il existe d'autres régions régulatrices, absentes dans cette construction. Enfin, Tada et ses collaborateurs (2005) ont décrit une hyperméthylation au niveau du promoteur de *NQO1* dans les carcinomes humains hépatiques. Cette hyperméthylation réduit la transcription de *NQO1* (Tada, Yokosuka et al. 2005). Le même phénomène est observé pour le promoteur de *GSTP1*, un autre gène cible de Nrf2. Etant donné que les cellules EAhy926 sont des cellules hybrides résultant de la fusion entre des HUVEC et des cellules épithéliales de carcinome pulmonaire (A459), cela vaudrait la peine de vérifier le degré de méthylation des promoteurs de ces deux gènes dans les cellules EAhy926. Par contre, l'induction de l'expression génique de *HO-1* par le SIN-1 est bien marquée. Rappelons que la *HO-1* est une enzyme dont les effets antioxydants sont très bien décrits dans la littérature (voir point 2.4.1.2 de l'introduction). A plus long terme, il faudra tester le rôle de cette induction dans la réponse au SIN-1, par exemple, via des siRNA HO-1, pour voir si cette induction protège la cellule endothéliale, par exemple contre l'apoptose ou contre la nitratisation des protéines.

Nous avons également dans des expériences préliminaires, essayé de dégager certaines voies de signalisation qui pourraient aboutir à l'activation de Nrf2, après exposition des cellules au SIN-1. Nous avons testé plusieurs inhibiteurs de kinases : la wortmannine et le LY294002 pour inhiber la voie PI3K/Akt, le SB203580 pour inhiber la MAPK p38 et le SP600125 pour inhiber la MAPK JNK. Les résultats obtenus sont préliminaires, incomplets et doivent être confirmés (**figure III.11**), mais ils suggèrent l'implication possible de la voie PI3K/Akt. L'activation de la voie PI3K/Akt par le peroxy-nitrite a déjà été décrite dans la littérature. En effet, Kang et son équipe (2002) ont montré, par western blotting, la phosphorylation d'Akt, directement en aval de la PI3K, suite à la stimulation des cellules H4IIE avec le SIN-1. De plus, ils ont traité les cellules H4IIE en présence de SIN-1 et de la wortmannine ou du LY294002. Ces deux inhibiteurs de la PI3K ont complètement inhibé l'activation de Nrf2 (Kang, Choi et al. 2002). Li et son équipe (2006) ont également démontré l'implication de la PI3K dans l'activation de Nrf2 suite à la stimulation de cellules PC12 avec le SIN-1 (Li, Cha et al. 2006). Par contre, Shen et ses collaborateurs ont montré, contrairement à nos résultats, que p38 possède un rôle négatif sur l'activité transactivatrice de Nrf2 (Shen, Hebbar et al. 2004), ainsi que Yu et son équipe (Yu, Mandlekar et al. 2000). Il est prématuré de tirer des conclusions à l'heure actuelle, mais il faudra certainement retester les effets de ces inhibiteurs, mais aussi d'autres inhibiteurs, non seulement sur l'activité de liaison de Nrf2 à l'ADN, mais aussi sur son activité transactivatrice et sur l'expression au niveau ARNm de ses gènes cibles, après traitement des cellules avec du SIN-1.

En ce qui concerne la voie d'activation de Nrf2, nous avons donc clairement démontré que le peroxy-nitrite induit l'activation de Nrf2, sa liaison à sa séquence consensus 'ARE', sa translocation nucléaire, son activité transactivatrice ainsi que l'expression transcriptionnelle du gène *HO-1*. De plus, la voie de la PI3K permettrait l'activation du facteur de transcription Nrf2, alors que la voie de p38 aurait plutôt un rôle négatif sur l'activité de transactivation de Nrf2. Les données obtenues concernant les différentes voies éventuellement impliquées dans l'activation du facteur de transcription Nrf2 sont prématurées, mais la voie PI3K/Akt mérite certainement d'être étudiée plus à fond. Grâce à ces résultats, nous démontrons que les cellules EAhy926, incubées avec le SIN-1, se défendent contre le peroxy-nitrite en enclenchant l'activation de la voie Nrf2 qui permet entre autres d'induire des gènes impliqués dans des processus antioxydants tel le gène encodant la HO-1.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux effets du SIN-1 sur l'activation de la voie UPR. Nous avons ainsi pu démontrer que le peroxy-nitrite induit bien la voie UPR grâce à la mise en évidence par western blotting de la phosphorylation d'eIF2 α , substrat de la kinase PERK et l'expression du gène encodant la protéine chaperonne Grp94, chaperonne reconnue pour être régulée via les voies dépendant d'IRE1 et d'ATF6. Nos résultats sont conformes avec les données de Dickhout et ses collaborateurs (2005) qui ont montré que des cellules HAEC et HUVEC incubées avec le SIN-1, activent bien la voie UPR. Ils ont pu mettre en évidence par western blotting les protéines Grp94, eIF2 α phosphorylé, mais aussi la protéine chaperonne BiP/Grp78 (Dickhout, Hossain et al. 2005). Une des perspectives de ce travail est de suivre d'autres marqueurs de la voie UPR comme, par exemple, BiP/Grp78, ATF6 clivé et CHOP. Il faudrait également confirmer l'activation de la kinase PERK, qui phosphoryle eIF2 α , mais aussi Nrf2. En effet, l'originalité de ce travail est de démontrer que l'exposition au SIN-1 enclenche et la voie Nrf2, et la voie UPR. Une seconde perspective de ce travail sera de préciser dans quelle mesure l'activation de PERK est importante pour l'activation de Nrf2. C'est peut-être à cause de la phosphorylation de Nrf2 par PERK, que les inhibiteurs de PI3K/Akt ne parviennent pas complètement à inhiber l'activité de liaison à l'ADN de Nrf2.

Le peroxy-nitrite induit donc l'activation des voies Nrf2 et UPR, qui président des réponses cellulaires de défense et d'adaptation face à un stress oxydant. Néanmoins, si ce stress oxydant est trop important ou de trop longue durée, la cellule pourrait 'décider' d'entrer en apoptose. En effet, la voie UPR peut alors aboutir à l'expression de CHOP/Gadd153 afin d'induire l'apoptose de la cellule. Il faudra donc définir dans quelles conditions d'exposition au SIN-1 (concentrations plus élevées, temps d'exposition plus longs), les cellules EAhy926 basculent d'une réponse de défense à la mort cellulaire par apoptose. Une fois ces conditions définies, on pourra tester des siRNA dirigés contre Nrf2 et/ou contre PERK, et voir s'ils favorisent ou non l'apoptose des cellules EAhy926 suite à leur stimulation avec le SIN-1. Il faudra aussi tester les siRNA anti-HO-1 pour voir l'importance de la HO-1 dans l'éventuelle protection conférée par Nrf2 contre l'apoptose induite par le SIN-1. L'apoptose des cellules EAhy926 pourrait être étudiée grâce à la cytométrie en flux. En effet, cette technique permet de détecter différents marqueurs de l'apoptose tels que l'externalisation des phosphatidylsérines au niveau membranaire avec l'annexine-V, ou encore les caspases impliquées dans l'apoptose via des anticorps spécifiques. Si le SIN-1 induit bien une apoptose des cellules EAhy926 à plus long terme, il faudra vérifier l'implication de la caspase 4, associée au réticulum endoplasmique. En effet, son rôle dans l'apoptose face à un stress du réticulum prolongé, reste controversé (Hitomi, Katayama et al. 2004; Rao, Ellerby et al. 2004).

Enfin, lors de l'étude des effets du SIN-1 sur les cellules EAhy926, nous avons démontré que le peroxynitrite induit la formation de nitrotyrosines sur plusieurs protéines, non identifiées, ces nitrotyrosines étant détectées par western blotting. Encore une fois, ces résultats doivent être confirmés et nous pourrions utiliser une autre approche. En effet, la cytométrie en flux constitue une alternative intéressante pour la détection des nitrotyrosines. Pour cela, les anticorps secondaires, dirigés contre les anticorps primaires anti-nitrotyrosine, sont couplés à la phycoérythrine (PE) ou à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), compatibles avec les lasers du cytomètre en flux disponible en URBM (Radi, Peluffo et al. 2001). La nitratation des protéines induite par le SIN-1 est un sujet brûlant, car les nitrotyrosines commencent à être proposées comme un nouveau marqueur biochimique des maladies cardiovasculaires. En outre, certaines protéines semblent plus susceptibles de subir ces nitrations, dont certaines essentielles pour l'homéostasie endothéliale, telles que la cyclooxygénase-2 (COX2) et la prostacycline synthase (PCIS) (Peluffo et Radi, sous presse).

En conclusion, nous avons montré sur un modèle de cellules endothéliales en culture que le peroxynitrite induit bien dans un premier temps, l'activation des voies Nrf2 et UPR. A plus long terme, il faudra préciser les interactions entre ces deux voies et cerner les conditions à partir desquelles la cellule ne peut plus surmonter ce stress oxydant et entre en apoptose. Ce travail, en permettant une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires qui permettent à la cellule endothéliale de faire face au stress induit par le peroxynitrite, devrait nous permettre à plus long terme de pouvoir lutter plus efficacement contre le dysfonctionnement endothélial à la base des pathologies cardiovasculaires.

V. Bibliographie

- Alvarez, B. and R. Radi (2003). "Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins." Amino Acids **25**(3-4): 295-311.
- Bernales, S., F. R. Papa, et al. (2006). "Intracellular signaling by the unfolded protein response." Annu Rev Cell Dev Biol **22**: 487-508.
- Bonetti, P. O., L. O. Lerman, et al. (2003). "Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(2): 168-75.
- Bouis, D., G. A. Hospers, et al. (2001). "Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research." Angiogenesis **4**(2): 91-102.
- Cai, H. and D. G. Harrison (2000). "Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress." Circ Res **87**(10): 840-4.
- Cao, T. T., L. Ma, et al. (2005). "Increased nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2 activity protects SH-SY5Y cells against oxidative damage." J Neurochem **95**(2): 406-17.
- Cooke, C. L. and S. T. Davidge (2002). "Peroxynitrite increases iNOS through NF-kappaB and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells." Am J Physiol Cell Physiol **282**(2): C395-402.
- Cullinan, S. B. and J. A. Diehl (2006). "Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway." Int J Biochem Cell Biol **38**(3): 317-32.
- Cullinan, S. B., J. D. Gordan, et al. (2004). "The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase." Mol Cell Biol **24**(19): 8477-86.
- Cullinan, S. B., D. Zhang, et al. (2003). "Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival." Mol Cell Biol **23**(20): 7198-209.
- Dhakshinamoorthy, S., A. K. Jain, et al. (2005). "Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE)-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants." J Biol Chem **280**(17): 16891-900.

- Dickhout, J. G., G. S. Hossain, et al. (2005). "Peroxynitrite causes endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human vascular endothelium: implications in atherogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(12): 2623-9.
- Dinkova-Kostova, A. T., W. D. Holtzclaw, et al. (2005). "The role of Keap1 in cellular protective responses." Chem Res Toxicol **18**(12): 1779-91.
- Emeis, J. J. and C. J. Edgell (1988). "Fibrinolytic properties of a human endothelial hybrid cell line (Ea.hy 926)." Blood **71**(6): 1669-75.
- Farombi, E. O. and Y. J. Surh (2006). "Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection." J Biochem Mol Biol **39**(5): 479-91.
- Fleming, I. and R. Busse (1999). "Signal transduction of eNOS activation." Cardiovasc Res **43**(3): 532-41.
- Forstermann, U. and T. Munzel (2006). "Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace." Circulation **113**(13): 1708-14.
- Frankenfeld, C. N., M. R. Rosenbaugh, et al. (2006). "Separation and detection of peroxynitrite and its metabolites by capillary electrophoresis with UV detection." J Chromatogr A **1111**(2): 147-52.
- Freeman, M. W. (2006). "Statins, cholesterol, and the prevention of coronary heart disease." Faseb J **20**(2): 200-1.
- Gomes, A., E. Fernandes, et al. (2006). "Use of fluorescence probes for detection of reactive nitrogen species: a review." J Fluoresc **16**(1): 119-39.
- Gow, A. J., C. R. Farkouh, et al. (2004). "Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **287**(2): L262-8.
- Griendling, K. K. and R. W. Alexander (1996). "Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances." Faseb J **10**(2): 283-92.
- Hosoya, T., A. Maruyama, et al. (2005). "Differential responses of the Nrf2-Keap1 system to laminar and oscillatory shear stresses in endothelial cells." J Biol Chem **280**(29): 27244-50.

- Huang, H. C., T. Nguyen, et al. (2002). "Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription." J Biol Chem **277**(45): 42769-74.
- Ischiropoulos, H. (2003). "Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration." Biochem Biophys Res Commun **305**(3): 776-83.
- Ishikawa, M., S. Numazawa, et al. (2005). "Redox regulation of the transcriptional repressor Bach1." Free Radic Biol Med **38**(10): 1344-52.
- Jain, A. K., D. A. Bloom, et al. (2005). "Nuclear import and export signals in control of Nrf2." J Biol Chem **280**(32): 29158-68.
- Jaiswal, A. K. (2004). "Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression." Free Radic Biol Med **36**(10): 1199-207.
- Johansen, J. S., A. K. Harris, et al. (2005). "Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice." Cardiovasc Diabetol **4**(1): 5.
- Jourd'heuil, D., F. L. Jourd'heuil, et al. (2001). "Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite. Implications for peroxynitrite-mediated oxidation reactions in vivo." J Biol Chem **276**(31): 28799-805.
- Kang, K. W., S. H. Choi, et al. (2002). "Peroxynitrite activates NF-E2-related factor 2/antioxidant response element through the pathway of phosphatidylinositol 3-kinase: the role of nitric oxide synthase in rat glutathione S-transferase A2 induction." Nitric Oxide **7**(4): 244-53.
- Kensler, T. W., N. Wakabayashi, et al. (2007). "Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 89-116.
- Knepler, J. L., Jr., L. N. Taher, et al. (2001). "Peroxynitrite causes endothelial cell monolayer barrier dysfunction." Am J Physiol Cell Physiol **281**(3): C1064-75.
- Korhonen, R., A. Lahti, et al. (2005). "Nitric oxide production and signaling in inflammation." Curr Drug Targets Inflamm Allergy **4**(4): 471-9.
- Kwak, M. K., N. Wakabayashi, et al. (2004). "Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers." Mutat Res **555**(1-2): 133-48.

- Leonard, M. O., N. E. Kieran, et al. (2006). "Reoxygenation-specific activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 mediates cytoprotective gene expression in ischemia-reperfusion injury." Faseb J **20**(14): 2624-6.
- Li, M. H., Y. N. Cha, et al. (2006). "Peroxynitrite induces HO-1 expression via PI3K/Akt-dependent activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells." Free Radic Biol Med **41**(7): 1079-91.
- Mathy-Hartert, M., A. Mouithys-Mickalad, et al. (2000). "Effects of propofol on endothelial cells subjected to a peroxynitrite donor (SIN-1)." Anaesthesia **55**(11): 1066-71.
- Moulian, N., F. Truffault, et al. (2001). "In vivo and in vitro apoptosis of human thymocytes are associated with nitrotyrosine formation." Blood **97**(11): 3521-30.
- Nioi, P. and J. D. Hayes (2004). "Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors." Mutat Res **555**(1-2): 149-71.
- Numazawa, S. and T. Yoshida (2004). "Nrf2-dependent gene expressions: a molecular toxicological aspect." J Toxicol Sci **29**(2): 81-9.
- Oyadomari, S. and M. Mori (2004). "Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress." Cell Death Differ **11**(4): 381-9.
- Peluffo, G. and R. Radi (2007). "Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology." Cardiovasc Res.
- Perlstein, T. S. and R. T. Lee (2006). "Smoking, metalloproteinases, and vascular disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(2): 250-6.
- Radi, R., T. P. Cosgrove, et al. (1993). "Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence." Biochem J **290** (Pt 1): 51-7.
- Rubbo, H., R. Radi, et al. (1994). "Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives." J Biol Chem **269**(42): 26066-75.
- Ryter, S. W., J. Alam, et al. (2006). "Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications." Physiol Rev **86**(2): 583-650.

- Saito, K. and M. Kohno (2006). "Application of electron spin resonance spin-trapping technique for evaluation of substrates and inhibitors of nitric oxide synthase." Anal Biochem **349**(1): 16-24.
- Sankaranarayanan, K. and A. K. Jaiswal (2004). "Nrf3 negatively regulates antioxidant-response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene." J Biol Chem **279**(49): 50810-7.
- Schrammel, A., S. Pfeiffer, et al. (1998). "Activation of soluble guanylyl cyclase by the nitrovasodilator 3-morpholiniosydnonimine involves formation of S-nitrosoglutathione." Mol Pharmacol **54**(1): 207-12.
- Schroder, M. and R. J. Kaufman (2005). "ER stress and the unfolded protein response." Mutat Res **569**(1-2): 29-63.
- Schroder, M. and R. J. Kaufman (2005). "The mammalian unfolded protein response." Annu Rev Biochem **74**: 739-89.
- Setsukinai, K., Y. Urano, et al. (2003). "Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species." J Biol Chem **278**(5): 3170-5.
- Shen, G., V. Hebbar, et al. (2004). "Regulation of Nrf2 transactivation domain activity. The differential effects of mitogen-activated protein kinase cascades and synergistic stimulatory effect of Raf and CREB-binding protein." J Biol Chem **279**(22): 23052-60.
- Surh, Y. J., J. K. Kundu, et al. (2005). "Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals." J Nutr **135**(12 Suppl): 2993S-3001S.
- Szabo, C. and H. Ohshima (1997). "DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects." Nitric Oxide **1**(5): 373-85.
- Taniyama, Y. and K. K. Griendling (2003). "Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms." Hypertension **42**(6): 1075-81.
- Tarpey, M. M. and I. Fridovich (2001). "Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite." Circ Res **89**(3): 224-36.

- Tarpey, M. M., D. A. Wink, et al. (2004). "Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **286**(3): R431-44.
- Trostchansky, A., G. Ferrer-Sueta, et al. (2003). "Peroxynitrite flux-mediated LDL oxidation is inhibited by manganese porphyrins in the presence of uric acid." Free Radic Biol Med **35**(10): 1293-300.
- Ueno, T., Y. Urano, et al. (2006). "Mechanism-based molecular design of highly selective fluorescence probes for nitrative stress." J Am Chem Soc **128**(33): 10640-1.
- Warabi, E., W. Takabe, et al. (2007). "Shear stress stabilizes NF-E2-related factor 2 and induces antioxidant genes in endothelial cells: role of reactive oxygen/nitrogen species." Free Radic Biol Med **42**(2): 260-9.
- Widlansky, M. E., N. Gokce, et al. (2003). "The clinical implications of endothelial dysfunction." J Am Coll Cardiol **42**(7): 1149-60.
- Williams, I. L., S. B. Wheatcroft, et al. (2002). "Obesity, atherosclerosis and the vascular endothelium: mechanisms of reduced nitric oxide bioavailability in obese humans." Int J Obes Relat Metab Disord **26**(6): 754-64.
- Wu, J. and R. J. Kaufman (2006). "From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response." Cell Death Differ **13**(3): 374-84.
- Xu, C., B. Bailly-Maitre, et al. (2005). "Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions." J Clin Invest **115**(10): 2656-64.
- Yamaguchi, Y., F. Nasu, et al. (2007). "Oxidants in the gas phase of cigarette smoke pass through the lung alveolar wall and raise systemic oxidative stress." J Pharmacol Sci **103**(3): 275-82.
- Yamamoto, T. and R. J. Bing (2000). "Nitric oxide donors." Proc Soc Exp Biol Med **225**(3): 200-6.
- Yang, Z. and X. F. Ming (2006). "Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis." Clin Med Res **4**(1): 53-65.
- Yokoyama, M. (2004). "Oxidant stress and atherosclerosis." Curr Opin Pharmacol **4**(2): 110-5.

Yoshida, H. (2007). "ER stress and diseases." Febs J **274**(3): 630-58.

Yu, R., S. Mandlekar, et al. (2000). "Activation of p38 and c-Jun N-terminal kinase pathways and induction of apoptosis by chelerythrine do not require inhibition of protein kinase C." J Biol Chem **275**(13): 9612-9.

Zhang, K. and R. J. Kaufman (2004). "Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **279**(25): 25935-8.